

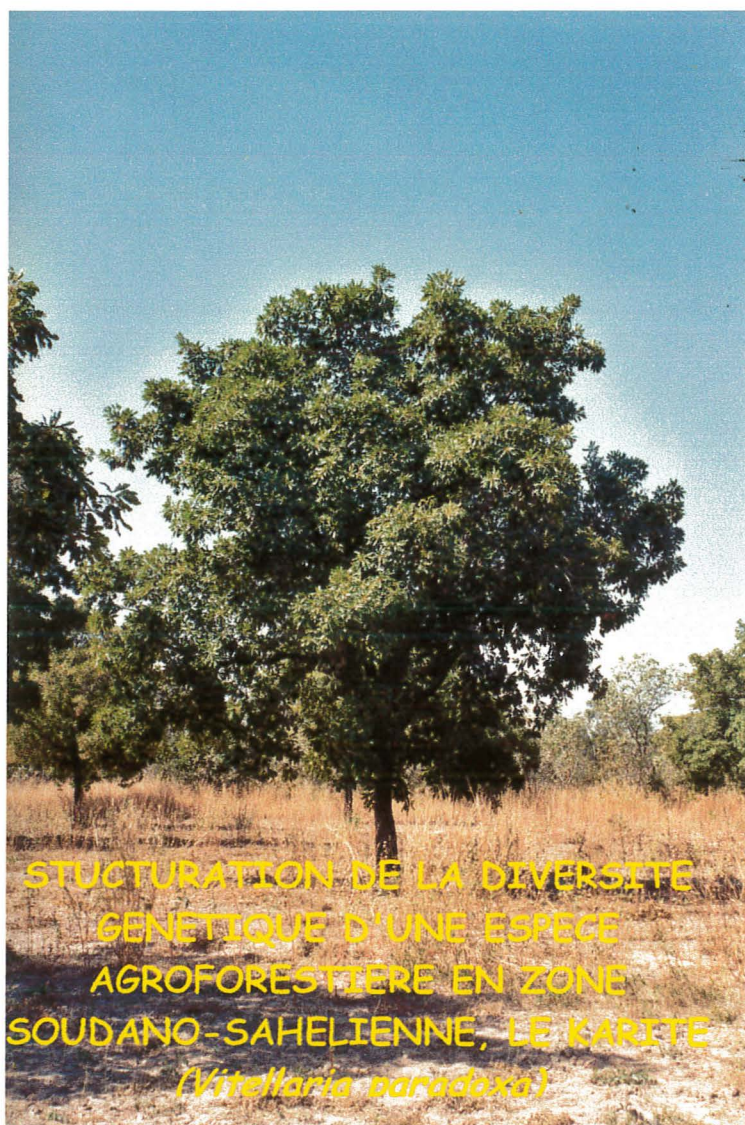


Université Pierre et Marie Curie
Paris 6



CIRAD-Forêt

**DESS gestion de la biodiversité :
Méthodologie d'étude et de valorisation
des ressources génétiques**



MEMOIRE DE STAGE

Responsable de stage : Jean-Marc Bouvet

Christelle Fontaine

Septembre 2002

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier M. Jean-Marc Bouvet pour m'avoir permis de réaliser ce stage ainsi que pour sa disponibilité, son aide et ses conseils précieux.

Un grand merci à Céline pour tous ses conseils et sa patience. Merci également à toutes les personnes du Cirad-forêt que j'ai côtoyées pour leur bonne humeur et leur sympathie : Alex, Roselyne, Mireille, Rabéa, David, Cyril...

Merci à M. Jean Maley et M. Jean-Louis Noyer pour tous leurs conseils.

Enfin, merci à Jean, à ma famille et à mes amis pour leur soutien.

LE CIRAD-FORET

Le Cirad (Centre de Coopération Internationale en Recherche agronomique pour le Développement) a pour mission de contribuer au développement rural des pays tropicaux et subtropicaux par des recherches, des réalisations expérimentales et des actions de formation.

Il comprend 28 programmes répartis en 7 départements.

J'ai réalisé mon stage au sein du département du Cirad-forêt, qui mène des activités de recherche pour le développement sur les forêts naturelles, les plantations forestières, les arbres ruraux et leur environnement, les produits forestiers et les interactions entre la nature et la société. Il est composé de trois programmes:

- Arbres et plantations
- Bois
- Forêts naturelles

Le programme "Arbres et plantations" s'est fixé plusieurs objectifs:

- Définir les bases sociales et économiques d'une gestion viable des plantations forestières et des formations agroforestières, prenant en compte les enjeux environnementaux globaux;
- Aider à la conservation, à l'évaluation, à l'utilisation et à la valorisation des ressources génétiques forestières;
- Participer à la définition et à la mise en œuvre de stratégies d'amélioration génétique adaptées aux principales espèces de plantation;
- Identifier les bases biologiques et les itinéraires sylvicoles de gestion durable des plantations prenant en compte les impacts environnementaux locaux.

Mon stage s'est déroulé dans le cadre du thème "Biodiversité et ressources génétiques: évaluation, conservation et valorisation".

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

LE CIRAD-FORET

INTRODUCTION 3

I- MATERIEL ET METHODES 6

A- MATERIEL: LE KARITE, *Vitellaria paradoxa* 6

B- METHODES 7

1°) EXTRACTION ET QUANTIFICATION D'ADN 7

2°) LA TECHNIQUE RAPD 7

3°) LES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES 8

4°) ANALYSE DES DONNEES 8

a) *Les analyses descriptives* 8

→ L'analyse Factorielle 9

→ La représentation arborée 10

b) *Les analyses de génétique des populations* 11

→ L'analyse de variance 11

→ Les indices de diversité 11

→ Analyse des microsatellites chloroplastiques 12

II- RESULTATS 14

A- LA TECHNIQUE RAPD 14

1°) LES AMORCES ET MARQUEURS 14

2°) STRUCTURATION ET ORGANISATION DE LA DIVERSITE 14

→ au niveau de l'aire naturelle 14

→ au niveau des groupes 15

• *Ouest* 15

• *Centre-est* 15

→ au niveau du "terroir": cas de l'Ouganda 16

B- LES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES	17
→ au niveau de l'aire naturelle	17
→ au niveau des groupes	19
• <i>Ouest</i>	19
• <i>Centre-est</i>	19
III- DISCUSSION	20
A- REFLEXION SUR LES TECHNIQUES UTILISEES	20
1°) LA TECHNIQUE RAPD	20
2°) LES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES	21
B- ORGANISATION ET STRUCTURE SPATIALE DE LA DIVERSITE DU KARITE DANS SON AIRE NATURELLE	23
1°) DIVERSITE GENETIQUE MISE EN EVIDENCE PAR LES MARQUEURS RAPD	23
2°) STRUCTURATION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES CHLOROTYPES	24
C- HYPOTHESES SUR L'ORIGINE DE LA STRUCTURATION DES CHLOROTYPES	25
D- APPORT DE CETTE ETUDE A LA TAXONOMIE DE <i>VITELLARIA PARADOXA</i>	27
E- INTERET DE CETTE ETUDE POUR LA GESTION DU KARITE	29
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	31
BIBLIOGRAPHIE	33
ANNEXES	
Annexe 1: EXTRACTION D'ADN	
Annexe 2: PROTOCOLE RAPD	
Annexe 3: PROTOCOLE MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES	
Annexe 4: ETUDE DE L'AIRE NATURELLE	
Annexe 5: ETUDE DES DEUX GROUPES	
Annexe 6: ETUDE DES POPULATIONS D'OUGANDA	
Annexe 7: ETUDE DE LA REPARTITION DES CHLOROTYPES	

INTRODUCTION



INTRODUCTION

L'Afrique sub-saharienne est constituée en majorité de savanes et de prairies et regroupe une large part de la population. Les cultures et l'élevage du bétail sont limités par les faibles précipitations (500 à 1500mm pour la zone soudano-sahélienne) et par le processus de désertification qui se définit par une détérioration du sol, des ressources en eau et pour les plantes. Dans cette région aride, les conditions de culture et de vie sont relativement difficiles (Rocheleau *et al.*, 1988).

Les parcs agroforestiers sont parmi les systèmes de culture les plus utilisés dans cette région. L'agroforesterie est une pratique où sont associés dans l'espace et dans le temps des arbres et des arbustes avec des cultures et/ou de l'élevage. Cette association est à la fois écologique et économique et constitue une approche pour l'utilisation des terres. En effet, les arbres sont maintenus à des fins utiles (bois de chauffage ou de construction, nourriture et/ou fourrage pour le bétail) et représentent des solutions face aux problèmes de dégradation du sol et des ressources en eau car ils augmentent la fertilité du sol en permettant la fixation de l'azote (Rocheleau *et al.*, 1988). Ces pratiques remontent très probablement au début de la domestication des espèces sauvages et ont eu un impact fort sur le paysage et la biodiversité. Les espèces ligneuses les plus fréquentes sont l'*Acacia albida*, le néré, le palmier et le karité.

Le Karité, *Vitellaria paradoxa* (CF Gaertn), autrefois nommé *Butyrospermum paradoxum* (Hepper), est l'élément majeur du système agroforestier de l'ouest africain depuis plus de 1000 ans (Lovett & Haq, 2000b). Il représente environ 80% des espèces ligneuses au sein des terres agricoles où l'exploitation est intensive, 85% dans les autres terres agricoles et, enfin, 10% dans les terres non gérées (Lovett & Haq, 2000a). Son aire de répartition se trouve au niveau de la zone semi-aride de l'Afrique sub-saharienne et s'étend du Sénégal à l'Ouganda. Il existe deux sous-espèces qui se différencient sur des caractères morphologiques (feuilles et fleurs) et dont la répartition géographique diffère : la sous-espèce *Vitellaria paradoxa paradoxa* (Kotschy) est présente au Bénin, au Burkina Faso, au Cameroun, en République Centrafricaine, au Tchad, en Côte d'Ivoire, en Guinée, en Guinée-Bissau, au Mali, au Niger, au

Nigeria, au Sénégal et au Togo ; la sous-espèce *nilotica* (Kotschy) se retrouve en Ethiopie, au Soudan, en Ouganda et au Zaïre (Hall *et al.*, 1996).

Dans la région soudano-sahélienne, le Karité constitue une des principales sources de matière grasse d'origine végétale. La pulpe de ses fruits est comestible et l'amande est riche en corps gras. Son importance économique est considérable car, outre sa consommation locale, l'amande de Karité est l'un des principaux produits d'exportation pour de nombreux pays de cette zone. En effet, son huile et son beurre sont utilisés en industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Grolleau, 1989). L'exploitation du beurre de karité est gérée soit individuellement par les femmes, soit par des associations féminines paysannes, en complément des travaux alimentaires de base, constitués essentiellement par la culture du mil. Cette activité représente pour elles une source de revenus non négligeable au niveau local (Couvet, 2001).

Par rapport à de nombreuses espèces forestières en milieu naturel, le Karité a été fortement influencé par l'homme. En effet, depuis des générations, lors des défrichements, les hommes ont sélectionné les arbres selon différents critères, comme leur état sanitaire, leur rendement et leur espacement : des variétés semi-domestiquées ont été sélectionnées (Lovett & Haq, 2000a). Des forces évolutives, à la base de la diversité génétique (dérive, sélection naturelle et migration), ont été également influencées par l'action de l'homme.

Par ailleurs, le Karité se trouve sur la liste des espèces d'arbres prioritaires pour la conservation *in situ* instaurée lors de la 4ème session du comité des experts de la FAO sur les Ressources Génétiques Forestières de 1977 (Lovett & Haq, 2000b).

Malgré son importance sur le plan économique et social, peu d'études ont été réalisées, notamment sur les déterminants pédo-climatiques et génétiques de la production de fruits et de corps gras ainsi que sur la répartition de cette diversité. Or, la connaissance du niveau de diversité génétique est nécessaire pour pouvoir définir des stratégies de gestion et de conservation (Moran & Hopper, 1987; Martin & Bermejo, 2000).

Mon stage a donc consisté à étudier la diversité génétique de *Vitellaria paradoxa* à différentes échelles (aire naturelle, région et "terroir") à l'aide de marqueurs moléculaires, que sont les RAPD et les microsatellites chloroplastiques. Leur utilisation a eu pour objectifs:

- de quantifier la diversité génétique intra- et inter-populations ainsi que le degré de structuration;
- d'aborder les relations phylogénétiques entre les populations, expliquées notamment avec la théorie des refuges pleistocènes;
- de préciser la taxonomie de l'espèce;
- et enfin, de définir à partir de ces résultats des recommandations sur le plan de la gestion (conservation et domestication) du karité.

MATERIEL ET METHODES



I - MATERIEL ET METHODES

A- MATERIEL : LE KARITE, *Vitellaria paradoxa*

Le Karité, *Vitellaria paradoxa* Gaertn. f., appartient à la famille des Sapotacées. C'est une espèce ligneuse allogame dont la taille moyenne varie selon le milieu dans lequel elle vit : en savane, le karité ne dépasse pas 10-15m à cause des feux qui sont fréquents; en champs cultivés, 15-20m et dans les aires protégées, il mesure environ 25m. Il a une durée de vie très longue qui peut atteindre plus de 200 ans. Il donne des fruits à partir de sa quinzième année mais il n'atteint sa pleine maturité qu'après sa vingt-cinquième année, ce qui explique en partie qu'il n'existe actuellement aucune plantation de karité. La phyllotaxie est spiralée, les fleurs sont hermaphrodites et se regroupent en inflorescences, les fruits sont indéhiscents et mesurent entre 4 et 5 cm et les graines sont récalcitrantes. La pollinisation se fait par les insectes, notamment par les abeilles. Le développement des fruits dure 4 à 6 mois et la dissémination des graines est surtout barochore mais elle peut être aussi zoochore (ongulés, chauve-souris, oiseaux, sans oublier l'homme qui consomme la pulpe du fruit) (Hall *et al.*, 1996).

C'est l'unique sapotacée des sols secs sous le climat sub-saharien, les quelques autres sapotacées qui le tolèrent étant confinées dans les galeries forestières (Aubreville, 1950).

Le karité se rencontre sous les isohyètes 500-1500 mm et préfère les sols-argilo-siliceux ou sablo-argileux avec une bonne couche d'humus (Yossi & Traore, 1987).

Il fait partie intégrante du milieu rural de la zone soudano-sahélienne et constitue un apport écologique et économique important.

Un échantillonnage a été réalisé sur toute l'aire naturelle du karité au sein de parcs agroforestiers, soit dans des champs soit dans des jachères (voir tableau 1). Aucune population n'est issue de forêts naturelles, non influencées par l'activité humaine.

Une première étude a été entreprise sur les populations de l'ouest (Sénégal à Bénin) ainsi que sur celles de l'Ouganda. Deux nouvelles populations ont été incluses, provenant du Cameroun et de République Centrafricaine.

B- METHODES

1°) EXTRACTION ET QUANTIFICATION D'ADN

Nous avons extrait l'ADN de 45 individus provenant de République Centrafricaine (20) et du Cameroun (25) à partir de 100mg de feuilles sèches, ainsi que celui des individus de la population globale pour lesquels il n'existait plus de solution mère, en suivant le protocole modifié de Bousquet *et al.* (1990) (voir annexe 1).

Nous avons ensuite réalisé la quantification de l'ADN grâce à un gel d'agarose et vérifié les résultats grâce au Fluoroskan qui est un appareil permettant de mesurer la quantité d'ADN.

2°) LA TECHNIQUE RAPD

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consiste en une amplification exponentielle d'un fragment d'ADN par deux amorces identiques, composées de 10 nucléotides choisis arbitrairement. Les amorces employées contiennent environ 50% de guanine et de cytosine, afin d'augmenter la stabilité des fragments d'amplification, ces deux bases étant reliées par trois liaisons hydrogènes. L'amorce va s'hybrider chaque fois que se trouve dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire. Si les deux sites d'hybridation sont à moins de 3000 pb l'un de l'autre et en opposition, c'est-à-dire dans une configuration permettant la PCR, l'amplification aura lieu (Pacault, 1999). Si l'un de ces deux sites est absent chez un individu, il n'y aura pas d'amplification et un polymorphisme de présence/absence sera observé (De Vienne, 1998).

Cette technique permet de révéler simultanément une dizaine de loci par amplification. La révélation du polymorphisme se fait sur gel d'agarose 1,5% pour séparer les différents fragments, suivie d'une coloration au bromure d'éthidium (BET) pour visualiser les fragments amplifiés.

Cette technique a été largement utilisée pour l'étude de la structuration génétique de populations et des relations phylogénétiques (Wu *et al.*, 1999).

Nous avons repris les 8 amorces déjà utilisées pour les premières études du karité (B7, B11, N15, R15, W9, W12, W13 et X3) que nous avons appliquées aux nouveaux échantillons.

Nous avons utilisé 7 nouvelles amorces (X11, Y20, Y6, Y13, X6, W19 et W5) sur toute la population, afin d'augmenter le nombre de marqueurs (voir annexe 2).

3°) LES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

L'ADN chloroplastique (ADNcp) est une molécule haploïde circulaire, de petite taille (entre 150 et 200 kb), très peu variable entre les différentes espèces. Il code pour environ 30 ARNt et 50 protéines participant au photosystème. L'hérédité est uniparentale: chez la plupart des Angiospermes, la transmission est maternelle (Ndoyé, 2001).

Il a été totalement séquencé chez plusieurs espèces, ce qui a permis de repérer des zones génomiques très conservées, localisées généralement dans des gènes, et qui flanquent des zones plus polymorphes (de Vienne, 1998; Viard *et al.*, 2001). Des amorces universelles ont donc été créées, permettant d'amplifier des microsatellites. Contrairement au génome nucléaire, l'ADNcp possède peu de microsatellites. Ce sont des séquences formées par la répétition de A ou de T. La variabilité se traduit par le nombre de ces répétitions. Les microsatellites chloroplastiques sont de bons marqueurs pour l'évaluation de la structure génétique des populations (Weising & Gardner, 1999). En effet, à cause de leur transmission uniparentale, les microsatellites chloroplastiques permettent de mettre en évidence des niveaux de différenciation entre les populations (Parducci *et al.*, 2001).

Nous avons testé les 10 amorces de microsatellites chloroplastiques mises au point par Weising et Gardner (1999), ccmp 1 à ccmp 10. Nous avons également testé les amorces RCt et NTCP, mises au point sur l'igname par le laboratoire BIOTROP du Cirad (voir annexe 3).

4°) ANALYSES DES DONNEES

a) *Les analyses descriptives*

Nous avons tout d'abord utilisé des analyses descriptives afin de visualiser la diversité génétique du karité dans son aire naturelle. En effet, les analyses factorielles et les méthodes

arborées donnent une représentation graphique des données du tableau et permettent de faire ressortir une structuration de la diversité (Raulin, 2001).

→ L'analyse factorielle

Les méthodes d'analyse factorielle ont pour objectif de représenter les structures les plus fortes dans les populations étudiées et d'éliminer les particularités ponctuelles qui gênent la perception générale des phénomènes. Elles permettent d'obtenir une représentation géométrique des mesures de dissemblance entre unités. Cette représentation permet de manipuler de façon concrète la notion de diversité. En effet, on aboutit à une décomposition hiérarchisée de la diversité, qui permet de distinguer les tendances fondamentales des variations particulières (Perrier *et al.*, 1999).

L'Analyse Factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) permet d'étudier une population de I individus décrits par J variables qualitatives (Escofier & Pagès, 1998). Le tableau 0-1, obtenu par la technique RAPD (absence/présence d'une bande), est transformé en tableau disjonctif complet, afin de rendre les données homogènes. La mesure de ressemblance des individus est basée sur la distance du Khi-2, qui possède les propriétés d'une distance euclidienne classique, donc représentable graphiquement dans un plan factoriel. Elle permet en plus de revaloriser les lignes et les colonnes les plus faibles. La contribution de chaque axe à l'inertie totale est donnée en pourcentage et la qualité de la projection de chaque point est donnée par la valeur du cosinus carré (Raulin, 2001). Nous avons utilisé cette analyse pour observer la répartition des individus sur les différents plans.

L'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) a pour but de décrire le maximum de l'information contenue dans un tableau de contingence (ou tableau croisé). Il s'agit d'un tableau d'effectifs obtenus en croisant les modalités de deux variables qualitatives définies sur une même population de n individus (Escofier & Pagès, 1998). Le terme de correspondance provient du fait que l'on cherche à mettre ces deux ensembles de caractères en correspondance (Dervin, 1988). Nous avons employé cette analyse afin de visualiser la répartition des différentes populations, et non plus des individus.

Afin de pouvoir réaliser ces analyses, nous avons utilisé le logiciel de statistique Xlstat version 5.0 (développé par T. Fahmy, fahmy@Xlstat.com).

→ La représentation arborée

Elle permet de représenter les relations individuelles, en montrant la proximité qu'il existe entre les individus. Pour cela, il est nécessaire de définir un indice de similarité S , qui est une mesure de ressemblance entre individus. Il existe ainsi de nombreux indices.

Pour les marqueurs RAPD, dominants, nous avons choisi l'indice de Sokal et Michener, qui tient compte à la fois des présences et des absences de bandes. Il se calcule de la façon suivante (Perrier *et al.*, 1999):

$$S_{ij} = (a+d) / P$$

a : nombre de marqueurs présents simultanément chez i et j ;

d : nombre d'absences en commun;

b : nombre de présence chez i et d'absence chez j ;

c : situation inverse;

$$P = a+b+c+d$$

Lors de la construction de l'arbre, les individus sont regroupés par la méthode du Neighbour-Joining, proposée par Saitou et Nei en 1987, algorithme itératif utilisant le critère du voisinage relatif, basé sur le principe de parcimonie qui conduit à la minimisation de la longueur totale de l'arbre (Etienne, 2001).

Nous avons utilisé le logiciel DARwin 3.6, développé par X. Perrier et J.P. Jacquemoud-collet (Perrier@cirad.fr; jacquemoud-collet@cirad.fr).

Nous avons également employé la méthode de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) du logiciel Xlstat, afin d'obtenir des dendogrammes. Pour cela, nous avons utilisé la distance du Khi-2 et l'agrégation par lien moyen.

b) *Les analyses de génétique des populations*

Après avoir réalisé une première analyse de données avec les méthodes descriptives, il apparaît indispensable de la compléter par des tests statistiques et par le calcul d'indices de diversité.

→ L'analyse de variance

Elle est utilisée avec les marqueurs RAPD pour estimer les composantes de la variance totale, qui sont la variance entre groupes, entre populations dans le groupe et entre individus (ou entre populations et entre individus dans les populations).

Toutes ces analyses sont effectuées par le logiciel WINAMOVA 1.55, développé par L. Excoffier (Excoffier *et al.*, 1992).

→ Les indices de diversité

L'indice de diversité de Nei h (1973) s'utilise surtout avec des marqueurs codominants et n'est donc pas le plus apte à traduire la diversité avec les marqueurs RAPD, qui ont tendance à surestimer les fréquences des allèles et à sous-estimer la diversité génétique intra-population (Lynch & Milligan, 1994). En effet, les marqueurs dominants peuvent être considérés comme des locus à deux allèles particuliers puisqu'un seul est visualisable, l'autre étant un allèle nul non matérialisé sur le gel. On emploie le terme de dominant car il est impossible de connaître le nombre de copie d'un allèle pour un locus particulier et donc de distinguer les homozygotes des hétérozygotes (Perrier *et al.*, 1999).

On utilise donc un autre indice, l'indice de Shannon H_o , mis au point par King et Schaal en 1989, qui est insensible au biais occasionné par l'incapacité à détecter des individus hétérozygotes. On le calcule suivant l'équation:

$$H_o = -\sum p_i \cdot \log_2 p_i$$

Où p_i est la fréquence des phénotypes RAPD (présence ou absence de la bande).

Cet indice est utilisé pour quantifier la diversité génétique et il a été calculé au niveau de chaque locus, de chaque population et de chaque groupe (Gillies *et al.*, 1997; Martin & Hernandez Bermejo, 2000).

Un indice de shannon intra-population moyen est ensuite défini:

$$H_o \text{ intra-population moyen} = \sum n_i * H_{o_i} / n$$

Où n_i correspond au nombre d'individus dans une population, H_{o_i} , son indice de shannon et n , le nombre d'individus total.

L'indice de différenciation génétique entre les populations, G_{st} , se calcule ensuite de la façon suivante:

$$G_{st} = (H_o \text{ total} - H_o \text{ intra-population moyen}) / H_o \text{ total}$$

Nous avons utilisé le logiciel POPGENE version 1.32, mis au point par F.C Yeh, R.C. Yang et T. Boyle (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>).

→ Analyse des microsatellites chloroplastiques

La fréquence des chlorotypes (F), les indices de diversité génétique H_s (diversité génétique moyenne intra-population) et H_t (diversité génétique totale) et le G_{st} , indice de différenciation génétique entre les populations ($G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$), ont été calculés par le logiciel HAPLODIV (Pons & Petit, 1995) (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/software>):

$$F_i = \sum p_i / n$$

Où p_i est la fréquence du chlorotype i dans une population et n , le nombre de populations

$$H_s = \sum (1 - \sum x_{ki}^2) / n$$

Où x_{ki} est la proportion d'individus ayant l'allèle i au sein de la k ème population et n , le nombre de populations.

$$H_t = 1 - \sum x_{.i}^2$$

Où $x_{.i} = \sum x_{ki} / n$ (Pons & Petit, 1995).

En complément des estimateurs de Pons et Petit (1995), la diversité chloroplastique à l'intérieur des populations a également été calculée en estimant le nombre efficace de chlorotypes (n_e):

$$n_e = 1 / (\sum p_i^2)$$

Où p_i est la fréquence du chlorotype i dans une population.

Enfin, on a estimé l'indice de diversité H_e , utilisable pour des populations de petite taille:

$$H_e = (n / (n - 1)) (1 - \sum p_i^2)$$

Où n est le nombre d'individus analysés dans une population (Echt *et al.*, 1998).

Ennos (1994) a montré que les niveaux de différenciation entre les populations estimés à partir de marqueurs nucléaires (Gst_n) et chloroplastiques (Gst_c) pouvaient être utilisés pour définir un rapport entre les flux de gènes par pollen et par graines, selon la formule:

$$r = mp / ms = [((1/ Gst_n) - 1) - 2 ((1/Gst_c) - 1)] / [(1/Gst_c) - 1]$$

où mp et ms sont les taux de migration du pollen et des graines (Raspé *et al.*, 2000).

Enfin, une distance génétique, basée sur la longueur des marqueurs, a été calculée entre les chlorotypes:

$$D_{sh}^2 = 1/m \sum [\sum |(a_{ik} - a_{jk})|]^2$$

Où m est le nombre de locus polymorphe et a , la longueur en paires de bases du marqueur au locus k pour les chlorotypes i et j (Echt *et al.*, 1998).

RESULTATS

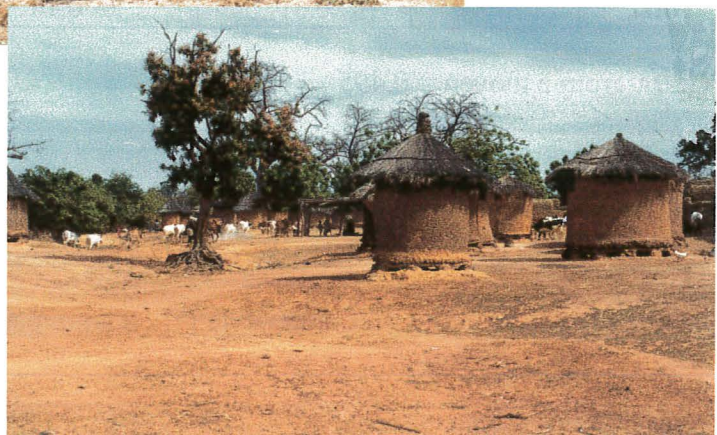


Tableau 2 : AMORCES ET MARQUEURS RAPD

Amorces	Nb de marqueurs (bandes)	Taille des bandes(pb)
B7	6	450-1030
B11	4	520-850
N15	5	680-1670
R15	3	530-1260
W9	1	810
W12	1	625
W13	6	510-1050
X3	4	630-1200
X11	4	390-950
Y6	4	400-900
Y13	7	500-1250
Y20	3	590-970
X6	3	450-1200
W19	13	290-1075
W5	2	400-700

ANALYSES STATISTIQUES SUR L'AIRE NATURELLE

Tableau 3 : Indice de shannon (Ho), erreur standard (ES) et indice de différenciation génétique (Gst) des deux groupes de populations au sein de l'aire naturelle

Populations	n	Ho intra-groupe	Erreur standard (ES)
Ouest	88	0.49	0.17
centre-est	60	0.5	0.16
Total	148	0.51	0.14

Ho intra-groupe moyen = 0.495

G st = 0.03

Tableau 4 = AMOVA sur l'aire naturelle en considérant deux groupes (les populations de l'Ouest d'une part et celles du Centre et de l'Est d'autre part)

Source variation	ddl	SC	Carré moyen	variance	% de variance	P value
entre groupes	1	125.79	125.79	1.75	12.2	< 0.001
dans groupe	133	1672.52	12.57	12.58	87.8	< 0.001

II- RESULTATS

A- LA TECHNIQUE RAPD

1°) LES AMORCES ET MARQUEURS

Les 15 amorces testées ont permis d'obtenir 66 marqueurs (voir tableau 2). Pour chaque amorce, on a entre 1 (W9 et W12) et 13 (W19) marqueurs. Le tableau disjonctif (présence 1- absence 0) a pu ainsi être complété.

Les pourcentages de loci polymorphes varient entre 65.15% pour la population d'Angetta située en jachère (Ouganda) et 95.45% pour celle du Cameroun.

2°) STRUCTURATION ET ORGANISATION DE LA DIVERSITE

→ au niveau de l'aire naturelle

L'analyse de la diversité génétique par des méthodes descriptives (AFCM, arbre Neighbour Joining; AFC et dendrogramme, Figures 1 et 2 en annexe 4) a permis de mettre en évidence 2 groupes: le premier est constitué par les populations de l'Afrique de l'ouest (Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali et Sénégal) et le second, par celles de l'Afrique centrale (Cameroun et République Centrafricaine) et de l'Afrique de l'est (Ouganda).

On constate qu'il existe une diversité génétique importante au sein des groupes (dispersion des individus), ce qui est confirmé par l'indice de shannon et l'analyse par AMOVA (voir tableaux 3et 4 ci-contre). En effet, les indices de shannon au sein des groupes sont du même ordre (0.49 pour l'ouest et 0.50 pour le centre-est) et le maximum de variance est expliquée par la variation au sein des groupes (87.8%; $P < 0.001$). Par contre, il existe très peu de structuration entre ces deux groupes ($G_{st} = 0.03$ et variation entre groupe très faible: 12.2 %; $P < 0.001$).

ANALYSES STATISTIQUES DU GROUPE OUEST

Tableau 5 : Indice de shannon (Ho), erreur standard (ES) et indice de différenciation génétique (Gst) pour les populations formant le groupe Ouest

Populations	n	Ho intra-population	ES
Bénin	14	0.45	0.22
Burkina BS	10	0.44	0.25
Burkina BP	6	0.39	0.28
Burkina BT	7	0.39	0.27
Côte d'Ivoire	16	0.46	0.22
Mali Mb	5	0.35	0.28
Mali Ma	18	0.42	0.23
Sénégal	12	0.4	0.24
TOTAL	88	0.49	0.17

Ho intra-groupe moyen = 0.41

G st = 0.16

Tableau 6 = AMOVA pour le groupe Ouest (formé par les populations du Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali et Sénégal)

Source variation	ddl	SC	Carré moyen	variance	% de variance	Pvalue
entre pop	7	151.14	21.59	1.04	8.46	< 0.001
ds pop	73	824.12	11.29	11.29	91.54	< 0.001

→ au niveau des groupes

• *Ouest*

On ne constate pas de structuration des populations: en effet, les individus de chaque population sont dispersés dans le plan F1 F2 de l'AFCM (qui représente 13% de l'information totale) (voir Figure 3, annexe 5). Néanmoins, grâce à l'étude de l'AFC, on peut distinguer une orientation est/ouest le long de l'axe F1 dans le plan F1 F2 (totalisant 46% de l'information globale). En effet, nous passons de la population du Bénin à celle du Burkina Faso (BT, BP et BS) puis à la Côte d'Ivoire, au Mali et enfin à la population du Sénégal.

Le dendrogramme montre qu'il existe des ressemblances entre les populations du Mali Ma et de la Côte d'Ivoire et entre celles du Bénin et du Mali Mb. On constate que les trois populations du Burkina Faso sont différentes: en effet, la population BT semble être la plus dissemblable des autres (dissimilarité de l'ordre de 9^{e-03}). Elle est proche de BP. Par contre, la population BS se rapproche plus de celles de Côte d'Ivoire et du Mali Ma (voir figure 4, annexe 5).

L'indice de shannon varie de 0.35 pour la population du Mali Mb à 0.46 pour celle de Côte d'Ivoire. Le G_{st} est faible (0.16). Cependant, cette différenciation entre les populations du groupe de l'ouest est plus importante que celle calculée entre les deux groupes (0.03). Enfin, l'analyse par AMOVA montre que le maximum de variation se trouve au sein des populations (91.54%; $P < 0.001$) (voir tableaux 5 et 6 ci-contre).

• *Centre-est*

L'AFCM montre que les populations du centre (Cameroun et République Centrafricaine) et de l'est (Ouganda) ne se mélangent pas. De plus, les individus sont très dispersés sur l'axe F1 F2 (contribuant à 17% de l'information globale) (voir Figure 5, annexe 5). Cette structuration se retrouve au niveau de l'AFC dans le plan F1 F2 (64% de l'information totale): en effet, l'axe F1 sépare l'Ouganda (repère négatif) de la Centrafrique et du Cameroun (repère positif). On retrouve cette correspondance dans le dendrogramme, où le calcul des dissimilarités permet de rapprocher d'une part les population du centre et d'autre part celles de l'Ouganda. On peut également noter que les population au sein des villages ougandais sont plus proches (voir Figure 6, annexe 5).

ANALYSES STATISTIQUES DU GROUPE CENTRE-EST

Tableau 7 : Indice de shannon (Ho), erreur standard (ES) et indice de différenciation génétique (Gst) pour les populations formant le groupe centre-est

Populations	n	Ho intra-population	ES
Centrafrique	13	0.47	0.22
Cameroun	13	0.51	0.19
Ouganda mCF	10	0.44	0.25
Ouganda mF	7	0.39	0.26
Ouganda nCF	9	0.31	0.25
Ouganda nF	8	0.3	0.26
TOTAL	60	0.5	0.16

Ho intra-groupe moyen = 0.4

G st = 0.2

Tableau 6 = AMOVA pour le groupe Centre-est (formé par les populations de Centrafrique, Cameroun et Ouganda)

Source variation	ddl	SC	Carré moyen	variance	% de variance	Pvalue
entre pop	5	148.11	29.62	2.07	15.32	< 0.001
ds pop	48	549.15	11.44	11.44	84.68	< 0.001

L'indice de shannon est plus variable, comparé au groupe formé par les populations de l'ouest: en effet, il fluctue entre 0.3 pour la population d'Ouganda nF et 0.51 pour celle du Cameroun. Le G_{ST} est plus important dans ce groupe (0.2). De même que pour les populations de l'ouest, le maximum de variation se retrouve à l'intérieur des populations (84.68 %; $P < 0.001$) (voir tableaux 7 et 8 ci-contre).

→ au niveau du "terroir": cas de l'Ouganda

L'étude de l'AFCM nous montre que les individus des deux villages, Amoya (m) et Angetta (n), ne se mélangent pas dans le plan F1 F2 (qui représente 19 % de l'information globale). On constate le même phénomène au sein des villages, entre les deux types de cultures, champ (CF) et jachère (F) (voir Figure 7, annexe 6). L'AFC sépare bien les quatre populations: dans le plan F1 F2 (représentant 80 % de l'information totale), l'axe F1 sépare les deux villages tandis que l'axe F2 sépare les deux types de culture dans chaque village. On peut noter que la séparation est plus importante pour Angetta. Néanmoins si on effectue une nouvelle analyse en ne tenant compte que des nouveaux marqueurs (X11 à W5), on constate que les populations sont plus groupées. En effet, une première étude RAPD avait été réalisée avec seulement une population d'Ouganda, Angetta CF.

Le dendrogramme montre que les deux populations d'Amoyai sont les plus semblables. Ces dernières se rapprochent plus de la population d'Angetta comprenant les individus situés en champs. Enfin, les arbres situés en jachère dans le village d'Angetta possèdent l'indice de dissimilarité le plus important (environ 0.015) (voir Figure 8, annexe 6).

L'indice de shannon varie de 0.3 pour la population en jachère d'Angetta à 0.44 pour celle en champ d'Amoyai. On peut remarquer qu'il est le plus faible dans les deux populations d'Angetta (0.31 et 0.3).

On retrouve une très faible structuration entre les populations ($G_{ST} = 0.16$) (tableau 9 page suivante).

L'analyse d'AMOVA montre qu'il existe davantage de variation au sein des villages (92.73 % de la variance totale). Une analyse a été réalisée pour chaque village et elle démontre que la variation se trouve dans les populations et non entre elles (95.75 % pour Amoyai et 83.3 % pour Angetta). On remarque néanmoins que le pourcentage de variation entre les deux

ANALYSES STATISTIQUES DES POPULATIONS DE L'UGANDA

Tableau 9 : Indice de shannon (Ho), erreur standard (ES) et indice de différenciation (Gst)
pour les populations d'Ouganda (Amoya champ et jachère; Angetta champ et jachère)

Populations	n	Ho intra-population	Erreur standard
Ouganda mCF	10	0.44	0.25
Ouganda mF	7	0.39	0.26
Ouganda nCF	9	0.31	0.25
Ouganda nF	8	0.3	0.26
total	34	0.43	0.22

Ho intra-groupe moyen = 0.36

G st = 0.16

Tableau 10 = AMOVA effectuée sur les populations d'Ouganda: entre les deux villages et au sein de chaque village, entre les deux types de culture (champ et jachère)

2 Villages (groupe = village)

Source variation	ddl	SC	Carré moyen	variance	% de variance	Pvalue
entre groupe	1	23.39	23.39	0.859	7.27	< 0.001
dans groupe	27	295.78	10.95	10.95	92.73	

Amoyai (population = type de culture: champ et jachère)

Source variation	ddl	SC	Carré moyen	variance	% de variance	Pvalue
entre pop	1	14.97	14.97	0.51	4.25	0.083
dans pop	13	150.1	11.55	11.55	95.75	

Angetta (population = type de culture: champ et jachère)

Source variation	ddl	SC	Carré moyen	variance	% de variance	Pvalue
entre pop	1	20.94	20.94	1.83	16.7	< 0.001
dans pop	12	109.78	9.15	9.15	83.3	

systèmes de culture est relativement élevé au niveau d'Angetta (16,7 %; $P < 0.001$) (tableau 10 ci-contre).

B- LES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

→ au niveau de l'aire naturelle

Sur les 10 amorces ccmp testées, 8 se sont hybridées avec l'ADNcp (ccmp 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 10), permettant d'amplifier les microsattellites qui ont été ensuite révélés sur gel d'agarose. Seule l'amorce ccmp 8 n'a donné aucun résultat sur gel d'acrylamide. Deux amorces se sont révélées polymorphes: ccmp 3 et ccmp 5, permettant d'obtenir 3 et 2 allèles, respectivement.

Pour les amorces RCt et NTCP mises au point (Marcon, 2002; Castillon, 2002), deux se sont révélées polymorphes pour le karité: NTCP 8 et 9, permettant d'obtenir à chaque fois 3 allèles.

On a ainsi obtenu 10 chlorotypes pour toute l'aire naturelle (voir tableau 11 et figure 9 à la page suivante). Chaque population possède un (Burkina BP et BT, Côte d'Ivoire, Mali Ma, Sénégal et Ouganda), deux (Bénin, Burkina BS, République Centrafricaine et Cameroun) ou trois chlorotypes (Mali Mb) (voir annexe 7).

Les fréquences des chlorotypes varient entre 0.01 (pour H) et 0.29 (pour J). On constate qu'il existe deux chlorotypes prépondérants, J et D. Le chlorotype J se trouve exclusivement dans les quatre populations ougandaises tandis que D se retrouve dans les trois populations du Burkina et dans celles de Côte d'Ivoire et du Mali Mb (voir tableaux 12 et 13, page suivante).

On constate que les distances calculées entre chlorotypes sont très variables et vont de 0.25 à 25. Deux haplotypes sont très différents des autres: H et I que l'on retrouve au Cameroun (voir annexe 7).

Les nombres efficaces des chlorotypes (n_e) vont de 1 à 2.778. L'indice de diversité intra-population des chlorotypes au sein de chaque population (H_e) varie donc de 0, pour les populations du Burkina BP et BT, de Côte d'Ivoire, du Mali Ma, du Sénégal et de l'Ouganda, à 0.8 dans la population du Mali Mb, qui est la seule à contenir 3 chlorotypes (voir tableau 13).

Tableau 11: Les 10 chlorotypes du Karité obtenus par 4 amorces polymorphes

Population	Chlorotype	Ccmp 3 (pb)	Ccmp 5 (pb)	NTCP 8 (pb)	NTCP 9 (pb)
Bénin	A	114	112	243	343
	B	114	112	243	344
Burkina BS	C	113	112	242	344
	D	113	112	242	345
Burkina BP	D	113	112	242	345
Burkina BT	D	113	112	242	345
Côte d'Ivoire	D	113	112	242	345
Mali Mb	D	113	112	242	345
	E	112	112	242	345
	F	113	112	244	345
Mali Ma	E	112	112	242	345
Sénégal	G	114	112	243	345
Centrafrique	A	114	112	243	343
	B	114	112	243	344
Cameroun	H	114	106	242	344
	I	114	106	243	345
Ouganda mCF	J	113	112	243	344
Ouganda nCF	J	113	112	243	344
Ouganda mF	J	113	112	243	344
Ouganda nF	J	113	112	243	344

Figure 9: Répartition des chlorotypes sur l'aire naturelle du karité

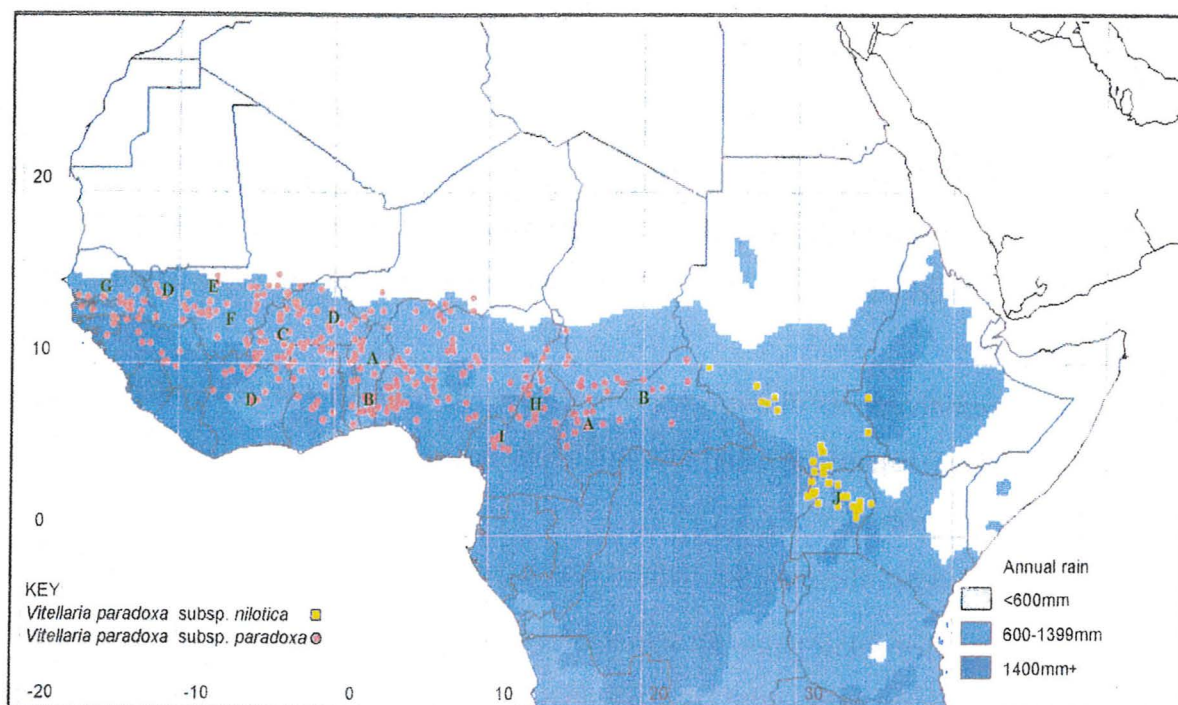


Figure 4.1. Distribution of *Vitellaria paradoxa* subsp. *paradoxa* and *V. paradoxa* subsp. *nilotica* in relation to mean annual rainfall (rainfall information from Scurlock *et al.*, 1995)

Tableau 12: Répartition des 10 chlorotypes au sein des 14 populations échantillonnées

Chlorotypes	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total
Bénin	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	14
Burkina BS	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	9
Burkina BP	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
Burkina BT	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	7
Côte d'Ivoire	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	16
Mali Mb	0	0	0	2	1	2	0	0	0	0	5
Mali Ma	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	11
Sénégal	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	7
Centrafrique	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	13
Cameroun	0	0	0	0	0	0	0	1	10	0	11
Ouganda mCF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9
Ouganda nCF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8
Ouganda mF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Ouganda nF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Total	20	7	8	31	12	2	7	1	10	27	125

Tableau 13: Fréquences (p_i), nombre efficace (n_e) et diversité intra-population (H_e) des chlorotypes au sein de chaque population et fréquences de ces chlorotypes données par le logiciel HAPLODIV (F_i)(Pons & Petit, 1995)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	n_e	H_e
Bénin	0.643	0.357	0	0	0	0	0	0	0	0	1.852	0.495
Burkina BS	0	0	0.889	0.111	0	0	0	0	0	0	1.247	0.222
Burkina BP	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Burkina BT	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Côte d'Ivoire	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Mali Mb	0	0	0	0.4	0.2	0.4	0	0	0	0	2.778	0.8
Mali Ma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Sénégal	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Centrafrique	0.846	0.154	0	0	0	0	0	0	0	0	1.352	0.282
Cameroun	0	0	0	0	0	0	0	0.09	0.91	0	1.199	0.183
Ouganda mCF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Ouganda nCF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Ouganda mF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Ouganda nF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Fréquences (F_i)	0.11	0.04	0.06	0.25	0.09	0.03	0.07	0.01	0.07	0.29		

ANALYSE DE LA STRUCTURATION GEOGRAPHIQUE DES CHLOROTYPES (par le logiciel HAPLODIV (Pons et Petit, 1995))

Tableau 14: Fréquences (F_i) des chlorotypes au sein de chaque groupe (Ouest et Centre-est)

Ouest

Chlorotypes	Fréquences (F_i)
A	0.08
B	0.04
C	0.11
D	0.44
E	0.15
F	0.05
G	0.13

Centre-est

Chlorotypes	Fréquences (F_i)
A	0.14
B	0.03
H	0.01
I	0.15
J	0.67

Tableau 15: Analyse de la structuration géographique des chlorotypes au sein de chaque groupe et sur l'ensemble de son aire naturelle: Hs (diversité génétique moyenne intra-population), Ht (diversité génétique totale), Gst (indice de différenciation génétique entre les populations à l'aide de marqueurs nucléaires (Gst_n) et chloroplastiques (Gst_c))

	Ouest	Centre-est	Aire naturelle
Hs	0.19	0.08	0.14
<i>erreur standard</i>	0.11	0.05	0.07
Ht	0.83	0.6	0.87
<i>erreur standard</i>	0.11	0.23	0.05
Gst_c	0.77	0.87	0.84
<i>erreur standard</i>	0.12	nc	0.07
Gst_n	0.16	0.2	0.03
r	15.58	24.83	168.16

L'indice de diversité génétique moyenne intra-population, H_s , est faible (0.14). Par contre, l'indice de diversité totale, H_t , est élevé (0.87). Enfin, l'indice de différenciation génétique est très élevé (0.84) alors que le G_{st_n} donné par les marqueurs RAPD est très faible (0.03).

Le calcul de r montre que les flux de gènes par pollen sont 168 fois plus importants que ceux par graines (voir tableau 15).

→ au niveau des groupes

• *Ouest*

Les populations de l'ouest sont caractérisées par 7 chlorotypes, A, B, C, D, E, F et G dont les fréquences varient entre 0.04 pour B et 0.44 pour D. H_s est faible (0.19) mais cependant plus élevé que celui de l'aire naturelle (0.14). H_t est élevé (0.83) et l'indice de différenciation G_{st} est fort (0.77 contre 0.16 avec les RAPD) (voir tableaux 14 et 15).

On constate que les chlorotypes C, F et G sont uniques et se retrouvent seulement dans les populations du Burkina BS, du Mali Mb et du Sénégal, respectivement (voir tableau 11).

• *Centre-est*

Ce groupe se compose de 5 chlorotypes, qui sont A, B, H, I et J. Leur fréquences sont très variables et vont de 0.01 pour H à 0.67 pour J. H_s possède une valeur faible (0.08) et H_t est élevé (0.6). Enfin, la différenciation est également forte au sein de ce groupe (0.87) (voir tableaux 14 et 15).

On remarque que la population du Cameroun possède deux chlorotypes uniques, H et I (voir tableau 11).

En comparant ces deux groupes, on constate que les populations de l'ouest possèdent une diversité génétique intra-population et totale plus importante. Par contre, elles sont moins différenciées ($G_{st} = 0.77$ comparé à 0.87 pour les populations de centre-est) et les flux de gènes par pollen sont plus faibles comparés à ceux de la population centre-est (15.58 fois plus élevés que les flux de graines contre 24.83 pour la population centre-est) (voir tableau 15).

On constate également que les G_{st} obtenus par marqueurs chloroplastiques (G_{st_c}) sont beaucoup plus importants que ceux obtenus par marqueurs RAPD (G_{st_n}).

DISCUSSION



III- DISCUSSION

A- REFLEXION SUR LES TECHNIQUES UTILISEES

Au cours de cette étude, nous avons employé deux types de marqueurs moléculaires, qui présentent chacun des avantages et des inconvénients. Il nous paraît intéressant de discuter ces choix.

1°) LA TECHNIQUE RAPD

De Vienne (1998) définit un "bon" marqueur génétique comme polymorphe, multiallélique, codominant (en effet, on peut différencier les individus homozygotes des hétérozygotes et avoir ainsi accès aux fréquences alléliques), non épistatique (c'est-à-dire qu'à partir du phénotype, on peut déduire le génotype; il n'y a pas d'interaction entre les loci), neutre (non fonctionnel) et non soumis à la pression de sélection du milieu. Or, les RAPD sont des marqueurs dominants et il nous paraît important de discuter de leur intérêt dans le cadre de notre étude.

La technique RAPD est facile à mettre au point, rapide, peu coûteuse et permet d'obtenir de nombreux marqueurs moléculaires, notamment chez les espèces où ni les sondes, ni les marqueurs PCR n'ont été développés.

Cependant, elle présente des inconvénients, comme son manque de répétabilité et la présence de bandes parasites. En effet, l'analyse effectuée par RAPD sur le karité a été réalisée en plusieurs fois, ce qui a posé des problèmes de répétabilité. Afin d'y remédier, nous avons choisi les bandes les plus nettes et pour éviter toute bande parasite, nous avons intégré dans nos gels un témoin (eau ultra pure).

De plus, elle fournit des marqueurs dominants qui ne permettent pas de distinguer les homozygotes des hétérozygotes, ni donc d'obtenir les fréquences alléliques car on sous-estime la fréquence des allèles récessifs (Lynch & Milligan, 1994; Gillies *et al.*, 1997; Pacault, 1999; Martin & Hernandez Bermejo, 2000). Afin de rendre négligeable le biais dans les calculs des paramètres, il est nécessaire d'échantillonner plus d'individus (de l'ordre de 2 à 10 fois plus) par

rapport aux marqueurs codominants. Il est également recommandé d'avoir plus de loci (Lynch & Milligan, 1994). Nous avons ainsi utilisé 15 amorces, permettant d'obtenir un nombre élevé de marqueurs (66). Les calculs de diversité génétique ont été réalisés avec l'indice de shannon, recommandé pour les RAPD, car il ne tient pas compte du biais engendré par l'incapacité à détecter des hétérozygotes. Il se calcule à partir de la fréquence des phénotypes RAPD, c'est-à-dire présence ou absence d'une bande.

Néanmoins, les RAPD sont de bons marqueurs pour les études de diversité génétique (Whitkus *et al.*, 1998). En effet, la diversité observée grâce à ces marqueurs est égale ou, le plus souvent, supérieure à celle obtenue par les allozymes. Ainsi, une étude réalisée sur le sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) avec les RAPD et les allozymes a permis de mettre en évidence un niveau égal de diversité et de différenciation entre les populations (Aagaard *et al.*, 1998). Une étude effectuée chez *Lactoris fernandeziana* (Lactoridaceae) n'a montré aucune variation avec les allozymes tandis qu'elle a détectée de la diversité grâce aux marqueurs RAPD (Esselman *et al.*, 2000). Ces derniers révèlent plus de diversité totale, de diversité intra-population et de différenciation par rapport aux allozymes (Wu *et al.*, 1999). De même, une étude de diversité génétique, réalisée sur *Theobroma cacao* avec des marqueurs RFLP et RAPD, a permis d'obtenir les mêmes résultats (N'Goran *et al.*, 1994).

Les marqueurs RAPD sont donc très utiles dans les analyses de variations intra-spécifiques (Chalmers *et al.*, 1994; Zhivotovsky, 1999).

2°) LES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

En complément de l'approche par les RAPD, il nous a semblé intéressant d'aborder la diversité génétique du karité par un autre type de marqueur, les microsattellites chloroplastiques car l'ADN chloroplastique présente de nombreux avantages.

En effet, le génome chloroplastique est très conservé à l'intérieur du règne végétal: l'ordre des gènes est très stable d'une espèce à l'autre. De plus, le taux de substitution nucléotidique de l'ADNcp est très inférieur à celui de l'ADN nucléaire, ce qui permet d'étudier la diversité au niveau intra-spécifique. De récentes études sur des espèces d'arbres d'Europe et d'Amérique du Nord ont montré que les zones de refuges et les routes de migration post-glaciaire pouvaient être identifiées grâce à l'ADNcp (King & Ferris, 1998).

Le fait que sa transmission soit maternelle chez les Angiospermes (uniparentale, donc absence de recombinaison) permet de voir le mouvement des graines et ainsi de pouvoir mettre en évidence les événements de colonisation (Muloko-Ntuhoume *et al.*, 2000). En effet, le niveau de différenciation est supérieur par rapport à une descendance bi-parentale (Ennos, 1994; Raspé *et al.*, 2000). Ainsi, la comparaison de la différenciation entre populations aux niveaux nucléaire et cytoplasmique permet de distinguer la part respective des flux de graines et de pollen dans la structure actuelle des populations. Enfin, les espèces végétales ne pouvant coloniser de nouveaux espaces que par l'intermédiaire des graines, la répartition spatiale du polymorphisme dans les génomes d'organites à transmission maternelle rend compte de la dynamique de la colonisation de l'espèce (de Vienne, 1998).

Ces caractéristiques font de l'ADN chloroplastique un matériel idéal pour les études de flux de gènes par graines, de phylogénie et de liens de filiations entre groupes taxonomiques (McCauley, 1994; Etienne, 2000; Raspé *et al.*, 2000; Vendramin *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2002). Néanmoins, une des conséquences du grand degré de conservation de l'ADNcp est qu'il est difficile de faire des distinctions entre des génomes très proches. On constate donc de très faibles diversités intra-population (Weising & Gardner, 1999).

Nous avons donc utilisé les microsatellites chloroplastiques pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les marqueurs microsatellites sont connus pour leur haut degré de polymorphisme, comparés à d'autres marqueurs moléculaires comme les PCR-RFLP, souvent utilisés lors de l'étude du génome chloroplastique (Sewell *et al.*, 1996; King & Ferris, 1998; Lumaret *et al.*, 2000; Muloko-Ntuhoume *et al.*, 2000; Raspé *et al.*, 2000). Ils permettent ensuite d'étudier la structuration de la diversité de l'ADNcp. En effet, ces marqueurs, transmis seulement par un parent, sont des indicateurs plus sensibles de la réduction de la taille des populations car ils possèdent un effectif efficace deux fois plus petit par rapport à un génome diploïde, ce qui les rend très utiles pour la détection de goulots d'étranglements (Parducci *et al.*, 2001).

Plusieurs modèles de mutations expliquent l'évolution des microsatellites. Le plus simple est le mode de mutation appelé SSM (Stepwise Mutation Model), basé sur le dérapage de la polymérase qui ajoute ou soustrait une unité de répétition. Mais, les problèmes d'homoplasie, inhérents à l'utilisation des microsatellites, limitent les études de phylogénie et de phylogéographie (Marshall *et al.*, 2002). En effet, deux allèles peuvent être identiques par leur état mais ne résultent pas d'une réplication successive d'un même ancêtre commun.

B- ORGANISATION ET STRUCTURE SPATIALE DE LA DIVERSITE DU KARITE DANS SON AIRE NATURELLE

1°) DIVERSITE GENETIQUE MISE EN EVIDENCE PAR LES MARQUEURS RAPD

L'étude de la diversité génétique du karité a été effectuée à différentes échelles: aire naturelle, région et terroir. Les marqueurs RAPD ont permis de mettre en évidence une diversité globale importante.

Nous avons séparé les 14 populations échantillonnées en deux groupes, le premier étant constitué par les populations de l'ouest (Bénin, Burkina, Côte d'Ivoire, Mali et Sénégal) et le second par celles du centre et de l'est (Cameroun, République Centrafricaine et Ouganda). Il est important de souligner que cette séparation est assez arbitraire car elle a été constituée à partir des résultats d'une Analyse Factorielle des Correspondances et du dendrogramme qui en a découlé. Or, la variabilité intra-population est toujours prépondérante à toutes les échelles et l'indice de différenciation entre les groupes est très faible, ce qui démontre l'existence de flux de gènes importants et donc pas de structuration entre les deux groupes.

Ces résultats sont en parfait accord avec des études effectuées sur les arbres tropicaux, montrant que la majorité de la diversité génétique se trouve à l'intérieur des populations. Les mouvements de pollen sur de longues distances et, parfois, la dispersion des graines par les animaux contribuent à des flux de gènes importants, ce qui réduit la variation entre les populations. De plus, les arbres tropicaux ont de forts taux d'allogamie (dont le karité), ce qui facilite les flux de gènes et ainsi diminue la diversité entre les populations (Hamrick *et al.*, 1991; Aide & Rivera, 1998).

Le calcul de r , basé sur des méthodes indirectes d'estimation des flux de gènes (calcul de G_{st}), permet de montrer que les flux de gènes par pollen sont beaucoup plus élevés que ceux par graines (15.58 pour le groupe de l'ouest, 24.83 pour celui du centre-est et 168.16 pour l'aire naturelle). Néanmoins, il faut tenir compte du fait que les RAPD ont amplifié à la fois de l'ADN nucléaire et cytoplasmique. Donc le G_{st_n} calculé serait plutôt le résultat des marqueurs nucléaire et cytoplasmique. Les valeurs trouvées pour r sont ainsi sous-estimées (en effet, en diminuant la valeur du G_{st_n} , on augmente le rapport $(1 / G_{st_n})$ et donc r).

Il est important de souligner que les individus échantillonnés proviennent de parcs agroforestiers. En champ, les flux de gènes par pollen sont probablement facilités par rapport à la forêt naturelle où la densité de karité est beaucoup plus faible.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Lovett et Haq (2000b) qui ont étudié la diversité génétique du karité à l'aide d'isozymes. Ils ont trouvé une valeur pour l'indice de Nei (H_e) élevée et peu d'isolation géographique (F_{st} faible) donc des flux de gènes importants.

A l'échelle du terroir (en Ouganda), on constate qu'il existe une légère variation entre les deux types de cultures (champs et jachère) au sein du village d'Angetta (16.7 % contre 4.25 % pour Amoyai). Or, ils ne sont espacés que d'environ deux kilomètres, alors que les deux villages sont situés à une cinquantaine de kilomètres l'un de l'autre. Cette différence peut être due au fait que les individus d'Angetta situés en champs ont été analysés lors d'une première étude et qu'il existe un biais engendré par des manipulateurs différents. En effet, une analyse reprenant seulement les derniers marqueurs permet de grouper un peu plus les populations. Une autre alternative serait que les arbres échantillonnés dans les deux types de parcelles soient à des stades de maturation différents. Or, en comparant la taille à hauteur de poitrine (DBH) et la hauteur des arbres au sein des quatre populations, on ne constate pas de différence. Enfin, cela pourrait provenir du faible échantillonnage prélevé dans les populations.

2°) STRUCTURATION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES CHLOROTYPES

La structuration de la diversité génétique apparaît différemment lorsque l'on utilise les microsatellites chloroplastiques.

La diversité génétique chloroplastique intra-population (H_s) est relativement faible, comparée aux RAPD. Ceci s'explique par le haut degré de conservation de la molécule d'ADNcp et par le fait qu'elle soit haploïde, ce qui la rend plus sensible à la dérive et donc réduit davantage le niveau de diversité intra-spécifique (Muloko-Ntoutoume *et al.*, 2000). Ainsi, H_s est de 0.19 pour le groupe de l'Ouest et de seulement 0.08 pour celui du Centre-est. Cette différence est due au fait que les populations d'Ouganda, représentant les 2/3 des

populations du groupe Centre-est et plus de la moitié des effectifs, possèdent le même chlorotype J qui leur est exclusif.

En revanche, la diversité génétique totale (H_t) est beaucoup plus importante, avec une valeur plus élevée pour le groupe de l'Ouest (0.83 contre 0.6 pour celui du Centre-est). En effet, les 10 chlorotypes obtenus sont inégalement répartis au sein de l'aire naturelle et on constate que la diversité chloroplastique est plus importante au sein du groupe Ouest (7 chlorotypes contre 5 dans le groupes Centre-est).

Les G_{st} sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus avec les RAPD: on trouve donc une structuration au sein des groupes et entre eux. Les valeurs de différenciation génétique sont généralement plus élevées en utilisant des marqueurs chloroplastiques, ceci à cause de leur descendance maternelle: en effet, les graines sont dispersées à de plus courtes distances que le pollen (McCauley, 1994; Echt *et al.*, 1998). De plus, en calculant le rapport entre les flux de gènes par pollen et par graines (r), on a constaté que les flux par pollen étaient beaucoup plus importants. Or, dans les espèces où les flux de gènes par graines sont moins importants que ceux par pollen, il est normal que les gènes chloroplastiques soient plus structurés comparés aux gènes nucléaires (King & Ferris, 1998). La dissémination des graines chez le karité est surtout barochore, ce qui participe à cette forte structuration.

C- HYPOTHESES SUR L'ORIGINE DE LA STRUCTURATION DES CHLOROTYPES

La dernière phase de mise en place des refuges glaciaires, appelée période du Würm (Dutech, 2001), s'est déroulée il y a 15 à 20 000 ans, au cours du Pleistocène. Durant cette période, les températures des régions tropicales ont baissé de 4 à 12 °C par rapport aux températures actuelles et les précipitations se sont faites plus rares (Aide & Rivera, 1998).

La théorie des refuges pleistocènes a été proposée pour la première fois par Haffer en 1969. Elle suggère que, durant les phases de glaciation, les espèces des forêts tropicales humides se sont maintenues dans des zones de superficie réduite, appelées refuges, près de l'équateur où la pluviométrie et les températures n'ont pas subi de forts changements (Aide &

Rivera, 1998). L'isolation des populations dans les refuges explique de hauts degrés d'endémisme et de biodiversité dans les régions tropicales (Willis & Whittaker, 2000).

Néanmoins, il est important de remarquer qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée concernant des refuges glaciaires pour les forêts sèches, où se trouve le karité à l'état naturel.

L'analyse des microsattellites chloroplastiques a permis de mettre en évidence la présence d'un chlorotype prépondérant (D), au niveau des populations centrales du groupe Ouest. De plus, on retrouve les mêmes chlorotypes (A et B) en République Centrafricaine et au Bénin, ce qui pourrait suggérer une origine commune à toutes ces populations. Néanmoins, les différences de longueur des microsattellites entre les chlorotypes sont très faibles et se jouent parfois à une paire de base. Ainsi, les chlorotypes du Bénin et de la République Centrafricaine semblent identiques alors que leurs séquences sont peut-être différentes.

Le Sénégal, le Cameroun et les populations du Mali Mb et du Burkina BS possèdent des chlorotypes uniques, ce qui tend à montrer qu'elles ont divergé par rapport aux autres populations, à cause du phénomène de dérive accentué chez l'ADNcp.

La population du Mali Mb possède 3 chlorotypes dont un unique et elle a l'indice de diversité intra-population (H_e) le plus élevé.

Des études portant sur la mangue, *Irvingia gabonensis* et *I. wombulu*, ont montré que la diversité génétique intra-population était plus élevée au sein des populations situées proches de refuges glaciaires, dans l'ouest du Nigeria, le sud du Cameroun et au Gabon (Newton *et al.*, 1999). On pourrait donc supposer que le Mali a comporté une zone refuge.

De plus, en comparant les distances génétiques basées sur les longueurs des marqueurs microsattellites, on remarque que le Cameroun possède deux chlorotypes uniques qui sont les plus éloignés des autres chlorotypes. Or on suppose l'existence d'un important refuge forestier montagnard dans l'ouest du Cameroun (Maley, 1994). On pourrait penser que, durant la dernière phase de glaciation, le karité se soit retrouvé isolé dans un refuge camerounais. En effet, Maley (1987) a montré qu'il y avait eu une vaste extension montagnarde, formée par les refuges de Haute-Guinée, Camerouno-Gabonais et du Zaïre oriental, qui a probablement formé une barrière entre les savanes soudaniennes au nord et zambéziennes au sud. Ceci pourrait expliquer les chlorotypes différents du Cameroun.

Enfin, il y a eu une forte réduction du couvert arboré en divers point des savanes, comme au Sénégal (Maley, 1994), ce qui peut peut-être expliquer le chlorotype unique trouvé dans la population échantillonnée dans ce pays.

Cependant, la théorie des refuges est très controversée (Willis & Whittaker, 2000): une des principales critiques est que les zones de refuges ont été fortement échantillonnées (Aide & Rivera, 1998). D'autres supposent qu'il n'y a pas eu que quelques refuges mais une multitude de micro-refuges, comme ce fut le cas pour les forêts d'Afrique centrale lors de leur réduction drastique il y a environ 2 500 ans (Maley, 2001).

On peut donc penser que le karité ne s'est pas retrouvé isolé dans quelques refuges mais dans une mosaïque de micro-refuges. Ceci pourrait expliquer la répartition et la structuration de ces chlorotypes.

Enfin, une troisième hypothèse pourrait servir à expliquer la structuration génétique du karité. Durant l'Holocène (dernière période géologique allant de -10 000 à nos jours, faisant suite au retrait des glaciers), des périodes chaudes et humides ont eu lieu, la plus récente s'étant terminée il y a environ 3 000 ans. Elles ont repoussé le karité vers le nord de son aire où les conditions environnementales de semi-aridité lui étaient favorables. On pourrait donc s'attendre à trouver une diversité génétique plus importante au sein des populations situées au nord de son aire naturelle actuelle, où les conditions de semi-aridité ont prévalu au cours du temps. Les résultats de cette étude montre que les populations situées au Mali, au nord du Cameroun et de la République Centrafricaine possèdent des indices de shannon et un nombre de chlorotypes élevés, ce qui peut permettre de corroborer cette hypothèse (Lovett & Haq, 2000b).

D- APPORT DE CETTE ETUDE A LA TAXONOMIE DE *VITELLARIA* **PARADOXA**

Chevalier (1943) a tout d'abord décrit 8 variétés réparties sur toute l'aire naturelle et ne semblant pas avoir de localisation géographique précise: *mangifolia*, *parvifolia*, *cuneata*, *serotina*, *poissoni*, *ferruginea*, *floccosa* et *nilotica*. Il les a différenciées sur des critères morphologiques. Il les a ensuite réduites à trois: *mangifolia*, *poissoni* et *nilotica* (Bonkoukou,

1987). La forte variabilité intra-population mise en évidence par les marqueurs RAPD, résultant de flux de gènes par pollen importants, explique l'absence de structuration qui existe entre ces populations. Ces différentes variétés décrites, sans répartition géographique particulière, pourraient n'être le résultat que d'une variabilité individuelle, ce qui pourrait remettre en cause cette notion de variété.

Actuellement, le karité est décrit sous deux sous-espèces: *Vitellaria paradoxa* *paradoxa* (Kotschy) et *Vitellaria paradoxa nilotica* (Kotschy) qui se différencient sur des critères morphologiques portant surtout sur les feuilles et les fleurs. Les feuilles de la sous-espèce *nilotica* sont plus larges que celles de *paradoxa* et les fleurs, plus grandes. L'écorce et la forme des fruits sont également différentes. Il est néanmoins important de souligner que de nombreuses données ont été collectées pour la sous-espèce *paradoxa* alors qu'on connaît peu de choses sur *nilotica* (Hall *et al.*, 1996).

L'origine de la séparation des deux sous-espèces reste floue. Certains auteurs pensent qu'il existe une coupure biogéographique majeure au niveau du Bassin du Tchad. Ainsi, White (1983) explique que la sous-espèce *nilotica* dériverait de populations isolées de "Haute" Afrique tandis que la sous-espèce *paradoxa* dériverait de populations isolées de "Basse" Afrique. Ceci reste néanmoins controversé.

Se pose ensuite la question de savoir si l'existence de la sous-espèce *nilotica* possède des bases génétiques. Il existe un chlorotype unique aux populations d'Ouganda. Or, on a constaté que la molécule d'ADNcp était plus sensible à la dérive, à cause de son haploïdie. Les populations d'Ouganda semblent donc avoir subi un effet de dérive. De plus, on constate que les indices de shannon les plus faibles se retrouvent dans la population d'Angetta, ce qui pourrait traduire l'existence d'un ancien goulot d'étranglement. Enfin, c'est au sein du groupe Centre-est que le Gst_n est le plus élevé (0.2). Tous ces remarques semblent ainsi corroborer le fait que ces populations aient divergé et qu'elles appartiennent à une sous-espèce différente.

Néanmoins, le chlorotype J semble très proche de ceux des populations de l'Ouest, au regard des distances calculées, basées sur la longueur des microsatellites. Mais, le fait que des chlorotypes soient de même longueur ou de longueur peu différentes ne veut pas dire qu'ils aient les mêmes histoires évolutives, à cause du phénomène d'homoplasie inhérent aux microsatellites. De plus, le Sénégal, le Cameroun et les populations du Mali Mb et du Burkina Faso BS possèdent des chlorotypes uniques et appartiennent à la même sous-espèce, c'est-à-dire *paradoxa*. D'ailleurs, il semble intéressant de remarquer que le Cameroun possède deux

chlorotypes particuliers, qui semblent plus éloignés des autres au niveau de la longueur des microsatellites, et pourrait peut-être aussi représenter une sous-espèce différente.

E- INTERET DE CETTE ETUDE POUR LA GESTION DU KARITE

Le karité représente une ressource importante de matière grasse, extraite des amandes fermentées (Arbonnier, 2000). Il joue un rôle économique et social majeur dans la zone soudano-sahélienne où il est considéré comme sacré par les populations rurales (Harlan, 1987; Lovett & Haq, 2000a), donc protégé et favorisé. Il apparaît intéressant de réfléchir aux recommandations que l'on peut tirer de cette étude en terme de conservation et de domestication de cette espèce.

Certains auteurs comme Soulé (1980) définissent la conservation comme la préservation des unités qui représentent la plus grande diversité, spécifique et intra-spécifique du vivant. La conservation d'une espèce passe par le maintien du maximum de sa diversité (Moran & Hopper, 1987). A la suite de la Convention sur la Diversité Biologique, qui s'est tenue à Rio de Janeiro en 1992, un niveau de diversité élevé a été accepté comme critère de conservation (Newton *et al.*, 1999). En effet, la diversité génétique est un élément essentiel pour garantir la durabilité et l'adaptabilité des populations d'arbres (Viard *et al.*, 2001). La conservation d'un niveau élevé de variabilité génétique intra-spécifique permet aux espèces de s'adapter à des changements intervenant dans leur environnement (Moran & Hopper, 1987; Hamrick *et al.*, 1991).

L'approche moléculaire par marqueurs neutres permet de mesurer la diversité et peut donc aider à la mise en place de stratégies de conservation et de domestication (Newton *et al.*, 1999). Néanmoins, elle est critiquée car elle ne donne pas directement accès à la variabilité des gènes codant pour les caractères adaptatifs et d'intérêt économique (Lande, 1999). Dans cette étude, nous avons utilisé les RAPD et les microsatellites chloroplastiques qui donnent accès au polymorphisme neutre, résultant de l'impact des forces évolutives que sont la dérive génétique, la migration et la mutation. Ils reflètent notamment l'histoire à long terme des

populations, permettant de détecter d'éventuels goulot d'étranglement (Etienne, 2001). Ces marqueurs, même s'ils ne possèdent pas la valeur informative des caractères adaptatifs ou agronomiques, peuvent être employés comme indicateurs de la différenciation entre les populations et de l'intensité des flux de gènes. Ils peuvent donc aider à la mise en place de projets de conservation et de domestication.

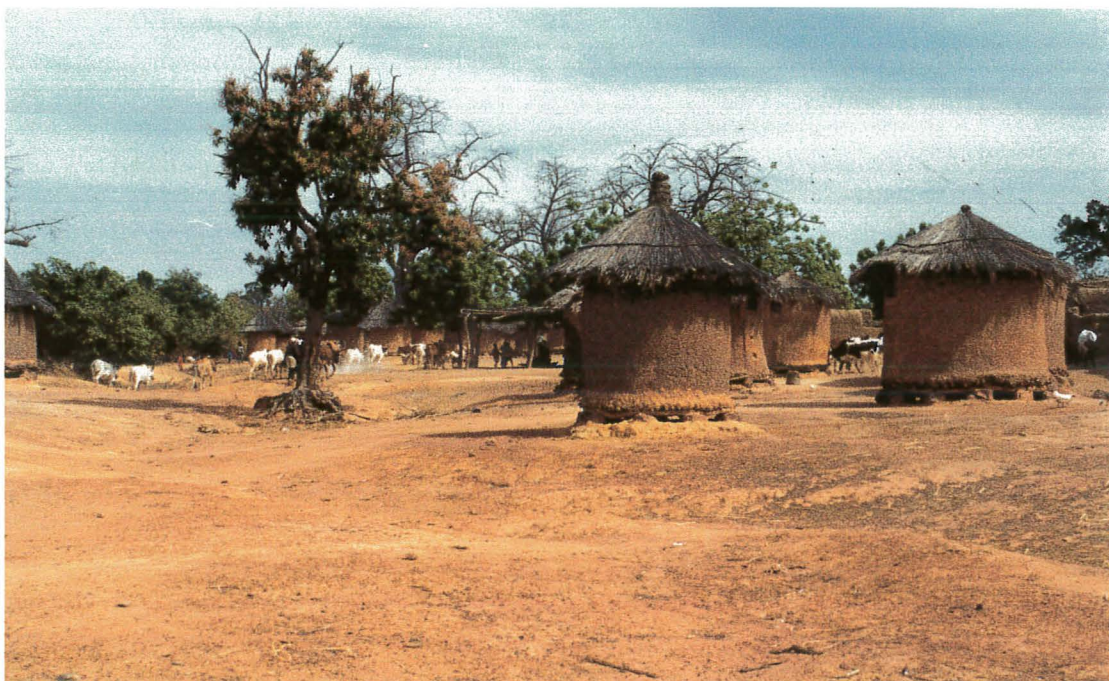
Pour une conservation *in situ* du karité, cette étude peut permettre de définir des zones d'implantation d'aires protégées, les plus représentatives de la diversité génétique globale de cette espèce. En effet, si l'on veut englober un maximum de diversité, il faut optimiser les différences qui existent entre ces populations. On pourrait choisir de préserver des populations provenant du Bénin, de la Côte d'Ivoire, de la République Centrafricaine ou alors des populations comme celle du Mali Mb, qui se singularisent au niveau de leur diversité. On pourrait également choisir de conserver des populations présentant des chlorotypes particuliers (comme au Cameroun et au Sénégal) et celles d'Ouganda qui semblent appartenir à une autre sous-espèce.

Si l'on souhaite conserver et gérer cette espèce au sein d'un pays, les efforts doivent porter sur un nombre restreint de populations et sur un échantillonnage important au sein de chaque population, à cause de l'importante diversité intra-population.

Pour une conservation *ex-situ* dynamique du karité, au sein d'un champ expérimental, cette étude permet d'orienter le choix des provenances. Si l'on veut capter le maximum de diversité génétique, il serait également intéressant d'échantillonner dans les populations les plus représentatives de la diversité génétique globale de l'espèce.

Dans le cadre d'un projet de domestication au sein d'un pays ou d'une région, si l'on veut constituer une base génétique pour son amélioration, il faut capter le maximum de diversité. Pour cela, il faut tenir compte des flux de gènes importants qui existent au sein de cette espèce. Il serait donc judicieux de sélectionner beaucoup d'individus dans peu de populations plutôt que peu d'individus dans beaucoup de populations, car on trouve le maximum de variation au niveau intra-population.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a consisté à étudier la structuration de la diversité génétique du karité sur son aire naturelle en utilisant deux marqueurs moléculaires neutres: les RAPD et les microsatellites chloroplastiques. Ceci nous a permis de discuter du choix de ces marqueurs, de l'organisation et de la structuration de la diversité génétique, des hypothèses expliquant la forte structuration des chlorotypes, de la taxonomie de *Vitellaria* et enfin, d'émettre des recommandations sur la gestion de cette espèce.

Elle mène à plusieurs perspectives de recherche.

Les marqueurs RAPD ont permis de mettre en évidence une diversité génétique importante chez le karité, à différentes échelles spatio-temporelles (aire naturelle, régions, "terroir"), avec une forte variabilité intra-spécifique et peu de différenciation entre les populations, ce qui s'explique par d'importants flux de gènes. Il serait néanmoins intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus par des marqueurs codominants, comme les microsatellites nucléaires, actuellement mis au point.

Les microsatellites chloroplastiques ont montré une importante structuration des populations, due à des flux de graines limités géographiquement, phénomène intensifié par une dissémination surtout barochore. Afin de pouvoir préciser les relations phylogénétiques entre chlorotypes et ainsi entre populations, il serait intéressant de séquencer les microsatellites au niveau des quatre loci polymorphes.

Enfin, pour améliorer les résultats obtenus, il serait intéressant d'augmenter la taille de l'échantillonnage, en prélevant plus d'individus au sein des populations échantillonnées et en élargissant l'étude à d'autres populations et à d'autres pays. Il serait notamment intéressant de pouvoir obtenir des échantillons de Guinée (où certaines hypothèses indiquent la zone du Fouta Djallon comme une zone refuge) du Nigeria (faisant le lien entre le Bénin et le Cameroun), du sud du Soudan (où on trouve également la sous-espèce *nilotica*, ce qui pourrait permettre d'affiner les recherches sur la taxonomie) et du sud du Tchad (où se situerait peut-être un coupure biogéographique).

Afin de voir l'impact des pratiques humaines sur la diversité de cette espèce, il serait intéressant de pouvoir comparer ces résultats avec ceux obtenus à partir d'échantillons récoltés en forêt naturelle. Cette étude est le sujet d'une thèse se déroulant actuellement au Mali.

L'étude de la diversité génétique des peuplements naturels pourrait permettre la mise en place de zones protégées.

Le karité est une sorte de "proto-culture", les arbres n'étant pas plantés mais conservés lors de défrichements de la forêt initiale ou des jachères. Une certaine sélection est effectuée dans les champs pour conserver les meilleurs producteurs. Comme la régénération se fait à partir d'arbres non sélectionnés ou de systèmes racinaires d'arbres abattus, il n'y a pas eu véritablement d'amélioration de l'espèce (Louppe, 1994). Il serait donc intéressant de réaliser une étude au sein des populations sur les caractères d'intérêts agronomiques, afin de mettre en place des programmes d'amélioration. Une étude de diversité génétique sur des caractères quantitatifs permettrait également de vérifier si la structuration observée sur les marqueurs neutres se retrouve au niveau de ces caractères.

BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard, J.E., Krutovskii, K.V., Strauss, S.H. (1998) RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*, **81**, 69-78.
- Aide, T.M., Rivera, E. (1998) Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia amata* (Moraceae): implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. *Journal of Biogeography*, **25**, 695-705.
- Arbonnier, M. (2000) Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. CIRAD, MNHN, UICN.
- Aubreville, A. (1950) Flore forestière soudano-guinéenne. Société d'Editions Géographiques, Maritimes et Coloniales, Paris. p 425-433.
- Bonkougou, E.G. (1987) Monographie du karité, *Butyrospermum paradoxum* (Gaertn.f.) Hepper, espèce agroforestière à usages multiples. Institut de Recherche en Biologie et Ecologie Tropicale, Centre de la Recherche Scientifique et Technologique.
- Castillon, C. (2002) Analyse génétique à l'aide de marqueurs microsatellites chloroplastiques de *Santalum insulare*. Mémoire de l'Université de Montpellier II.
- Chalmers, K.J., Newton, A.C., Waught, R., Wilson, J., Powell, R. (1994) Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**, 504-508.
- Chevalier, A. (1943) Le karité ou arbre à beurre. Essai monographique. *Revue Internationale de Botanique Appliquées et d'Agriculture Tropicale*, **23**, 100-120.
- Couvet, V. (2001) Modes de gestion paysans des parcs agroforestiers à karité (*Vitellaria paradoxa*) et à néré (*Parkia biglobosa*) au Burkina Faso et au Mali. Mémoire de fin d'étude ESITPA.
- De Vienne, D. (1998) Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA ed.
- Dervin, C. (1988) Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle des correspondances? STAT-ITCF. INRA, INA-PG.
- Dutech, C.C. (2001) Diversité génétique et dynamique de la forêt tropicale humide: le cas d'une espèce ligneuse guyanaise, *Vouacapoua americana* (Caesalpinaceae). Thèse de l'Université de Montpellier II.
- Echt, C.S., DeVerno, L.L., Anzidei, M., Vendramin, G.G. (1998) Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, **7**, 307-316.
- Ennos, R.A. (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.
- Escofier, B., Pagès, J. (1998) Analyses factorielles simples et multiples. Objectifs, méthodes et interprétation. DUNOD, Paris.
- Esselman, E.J., Crawford, D.J., Brauner, S., Stuessy, T.F., Anderson, G.J., Silva O., M. (2000) RAPD marker diversity within and divergence among species of *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae). *American Journal of Botany*, **87**(4), 591-596.
- Etienne, C. (2001) Contribution à la méthodologie de conservation d'une espèce forestière menacée, *Aniba rosaeodora* DUCKE. Mémoire de DEA. Ecole Doctorale de Biologie Intégrative. 18 p.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Gillies, A.C.M., Cornelius, J.P., Newton, A.C., Navarro, C., Hernandez, M., Wilson, J. (1997) Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, **6**, 1133-1145.
- Grolleau, A. (1989) Contribution à l'étude de la multiplication végétative par greffage du karité (*Vitellaria paradoxa* Gaertn.f. = *Butyrospermum paradoxum* Hepper). *Bois et Forêts des Tropiques*, **222**, 38-40.

- Hall, J.B., Aebischer, D.P., Tomlinson, H.F., Osei-Amaning, E., Hindle, J.R. (1996) *Vitellaria paradoxa*: a Monograph. School of Agricultural Sciences Publication Number 8, University of Wales, Bangor. 105 p.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Murawski, D.A., Loveless, M.D. (1991) Correlations between species traits and allozymes diversity: Implications for conservation biology. In: Genetics and Conservation of Rare Plants. D. Falk, Holsinger, K, eds. Oxford University Press, New York, p 75-86.
- Harlan, J.R. (1987) Les plantes cultivées et l'homme. Agence de Coopération Culturelle et Technique et Conseil International de la Langue Française, Paris, pour la traduction française. p 23; 75-77; 115-119.
- King, R.A., Ferris, C. (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, **7**, 1151-1161.
- Lande, R. (1999) Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. In: Genetics and the extinction of species. Landweber, L.F., Dobson, A.P., eds. Princeton University Press, Princeton. p1-22.
- Louppe, D. (1994) Le karité en Côte d'Ivoire. Rapport du Cirad-Forêt.
- Lovett, P.N., Haq, N. (2000a) Evidence for anthropic selection of the Sheanut tree (*Vitellaria paradoxa*). *Agroforestry Systems*, **48**, 273-278.
- Lovett, P.N., Haq, N. (2000b) Diversity of the Sheanut tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.) in Ghana. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **47**, 293-304.
- Lumaret, R., Amame, M., Ouazzani, N., Baldoni, L., Debain, C. (2000) Chloroplast DNA variation in the cultivated and wild olive taxa of the genus *Olea* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 547-553.
- Lynch, M., Milligan, B.G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91-99.
- Maley, J. (1987) Fragmentation de la forêt dense humide africaine et extension des biotopes montagnards au quaternaire récent: nouvelles données polliniques et chronologiques. Implications paleoclimatiques et biogéographiques. In: Paleoecology of Africa, 18, 307-334. Balkema, Eds. Rotterdam.
- Maley, J. (1994) Le cadre paléoenvironnemental des refuges forestiers africains: quelques données et hypothèses. In: The biodiversity of african plants. Van der Maesen, Van der Burgt, Van Medenbach de Rooy, Eds. p 519-535.
- Maley, J. (2001) Si la forêt tropicale m'était contée... *Canopée*, **19**, 6-9.
- Marcon, D. (2002) Analyse génétique d'une espèce forestière, *Santalum austrocaledonicum*, à l'aide de marqueurs microsatellites chloroplastiques. Mémoire de l'Université de Montpellier II.
- Marshall, H.D., Newton, C., Ritland, K. (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 367-378.
- Martin J.P., Hernandez Bermejo, J.E. (2000) Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Maire (Labiatae) using RAPD markers. *Heredity*, **85**, 434-443.
- McCauley, D.E. (1994) Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: Implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **91**, 8127-8131.
- Moran, G.F., Hopper, S.D. (1987) Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant végétation. In: Nature conservation: the role of remnants of native vegetation. Saunders, Arnold, Burbidge, Hopkins eds. p 151-162.
- Muloko-Ntoutoume, N., Petit, R.J., White, L., Abernethys, K. (2000) Chloroplast DNA variation in a rainforest tree (*Aucoumea klaineana*, Burseraceae) in Gabon. *Molecular Ecology*, **9**, 359-363.
- Ndoyé, K. (2001) La gestion des ressources génétiques au Sénégal: application au complexe d'espèces *Acacia nilotica*. Thèse de l'Université Cheikh Anta Diop.

- Newton, A.C., Allnutt, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J., Ennos, R.A. (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 140-145.
- N'Goran, J.A.K., Laurent, V., Risterucci, A.M., Lanaud, C. (1994) Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity*, **73**, 589-597.
- Pacault, I. (1999) Etude de la diversité génétique chez *Santalum austrocaledonicum* de Nouvelle-Calédonie par la technique Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Rapport de stage de maîtrise de l'Université de Montpellier II.
- Parducci, L., Szmidi, A.E., Madaghie, A., Anzidei, M., Vendramin, G.G. (2001) Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 733-740.
- Perrier, X., Flori, A., Bonnot, J. (1999) Les méthodes d'analyses de données. In: Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. Harmon, Seguin, Perrier et Glazmann Eds, Cirad collection Repères. p 43-73.
- Pons, O., Petit, R.J. (1995) Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 462-470.
- Raspé, O., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., Jacquemart, A.-L. (2000) Chloroplast DNA haplotype variation and population differentiation in *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). *Molecular Ecology*, **9**, 1113-1122.
- Raulin, A. (2001) Recherche de populations d'intérêt pour la gestion et la conservation *in situ* d'*Acacia tortilis raddiana* à l'aide de marqueurs chloroplastiques et AFLP. Mémoire de fin d'études d'Ingénieur des Techniques Agricoles.
- Rocheleau, D., Weber, F., Field-Juma, A. (1988) Agroforestry in Dryland Africa. ICRAF, Nairobi, p15-43; 75-114.
- Sewell, M.M., Parks, C.R., Chase, M.W. (1996) Intraspecific chloroplast DNA variation and biogeography of North American *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). *Evolution*, **50**(3), 1147-1154.
- Vendramin, G.G., Anzidei, M., Madaghie, A., Sperisen, C., Bucci, G. (2000) Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, **43**, 68-78.
- Viard, F., El-Kassaby, Y.A., Ritland, K. (2001) Diversity and genetic structure in populations of *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) at chloroplast microsatellite loci. *Genome*, **44**, 336-344.
- Weising, K., Gardner, R.C. (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, **42**, 9-19.
- White, F. (1983) The vegetation of Africa. UNESCO Natural Resources Research, **20**, 1-368.
- Whitkus, R., de la Cruz, M., Mota-Bravo, L., Gomez-Pompa, A. (1998) Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 621-627.
- Willis, K.J., Whittaker, R.J. (2000) The refugial debate. *Science*, **287**, 1406-1407.
- Wu, J., Krutovskii, K.V., Strauss, S.H. (1999) Nuclear DNA diversity, population differentiation and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome*, **42**, 893-908.
- Yossi, H., Traore, M.L. (1987) Actions thématiques sur la mortalité du karité (*Butyrospermum parkii* (G.DON) KOTSCHY) dans la région de Ségou (Mali). Institut National de la Recherche Zootechnique, Forestière et Hydrobiologique, Sotuba. p 18-27.
- Zhivotovsky, L.A. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, **8**, 907-913.

ANNEXES



ANNEXE 1: EXTRACTION D'ADN

(adaptation de la méthode de J. Bousquet *et al.*, 1990)

- Allumer le bain marie à 74°C
- Préparer la solution de tampon: la mettre à agiter puis dans le bain marie
- Numéroté 2 séries de tubes stériles de 15 mL et 1 série de tubes stériles de 1.5 mL
- Mettre 400 µL d'eau stérile dans les tubes de 1.5 mL
- Broyer 100 mg de feuilles sèches au mortier dans l'azote liquide
- Transférer dans un tube de 15 mL le broyat
- Ajouter 5 mL de tampon d'extraction à 74°C dans le mortier et transférer dans un tube de 15 mL
- Vortexer 10 sec
- Incuber 20 min à 74°C, agiter légèrement de temps en temps
- Laisser refroidir à température ambiante (environ 10 min)
- Ajouter 5 ml de CIAA, agiter par retournement (environ 100 fois) doucement
- Centrifuger 15 min à 5000 tours/min
- Transférer phase aqueuse dans des tubes de 15 mL
- Ajouter 5 mL d'isopropanol

→ si l'ADN est visible

- Agiter légèrement jusqu'à la formation de la pelote d'ADN
- Retirer la pelotte avec une pipette en verre préalablement flambée
- Tapoter sur du papier Kimberly Clark pour enlever l'alcool au maximum
- Mettre la pelote d'ADN dans le tube stérile de 1.5 mL contenant 400 µL d'eau stérile
- Mettre au bain-marie ou à l'étuve toute la nuit à 37°C

→ si l'ADN n'est pas visible

- Mettre le tube à -20°C durant 10 min
- Centrifuger à 5000 tours/min durant 5 min
- Mettre 15 min au speedvac
- Mettre les 400 µL d'eau prévue pour reprendre l'ADN dans le tube de 15 mL
- Le lendemain, transférer l'ADN dans le tube de 1.5 mL
- Quand les ADN ne sont plus visibles le lendemain, les mettre au frigo à -20°C

Tampon d'extraction: pour 500mL

- 50 mL de Tris HCl 1 M, pH=8
- 140 mL de NaCl 5M
- 20 mL d'EDTA 500mM
- 10 g de MATAB
- 5 g de PEG 6000
- 2.5 g de sulfite de sodium

Compléter à l'eau ultra pure

ANNEXE 2 : PROTOCOLE RAPD

PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL

MIX / puits: 20 μ L

Quantité d'ADN / puits: 5 μ L

MIX	Concentration, finale	Volume/échantillon
Tampon 2X	1X	12.5 μ l
Amorce 2 μ M	0,56 μ M	7 μ l
H ₂ O stérile		0.3 μ l
Taq ADN Polymérase 5U/ μ l	1U	0.2 μ l

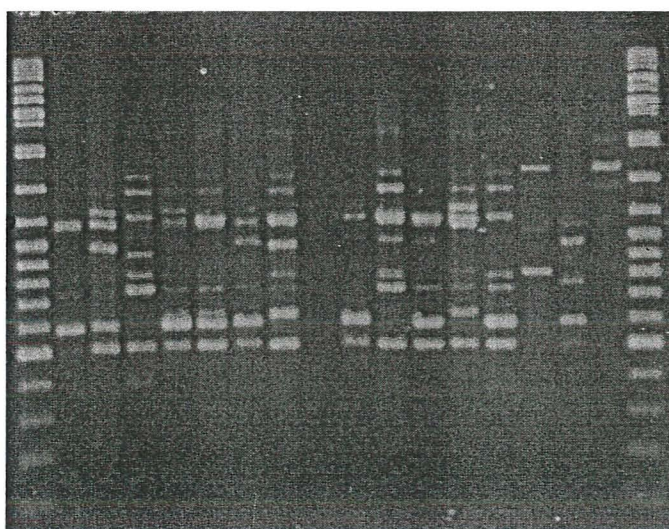
CONDITIONS PCR

Appareil : Techne Cyclogene

Dénaturation initiale	3 mn	94 °C	1 cycle
Dénaturation	1 mn	94 °C	45 cycles
Hybridation	1 mn	36 °C	
Elongation	2 mn	72 °C	
Elongation finale	10 mn	72 °C	1 cycle

VERIFICATION SUR GEL D'AGAROSE 1.5 %

- 1.2 g d'agarose
- 80 mL de TBE 0.5X



ANNEXE 3: PROTOCOLE MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES

POUR LES AMORCES CCMP 3 et 5

Mélange réactionnel

MIX/ puit: 8 µl

Quantité d'ADN / puit: 2 µl

MIX	Concentration finale	Volume/échantillon
Tampon 2X spécial	10X	5 µl
Mélange amorces 3' et 5' 10µM	0.5 µM	0.5 µl
H2O		2.3 µl
Taq polymérase 5U/µl	1U	0.2 µl

Condition PCR: Appareil: Thermocycleur "Stratagène" (Robocycleur)

Dénaturation initiale	4 min	94 °C	1 cycle
Dénaturation	30 sec	94°C	
Hybridation	1 min	Tm	30 cycles
Elongation	1 min	72°C	
Elongation finale	5 min	72°C	1 cycle

POUR LES AMORCES NTCP 8 et 9

Mélange réactionnel

MIX/ puit: 20 µl

Quantité d'ADN / puit: 5 µl

MIX	[Initiale]	[Finale]	Vol/échantillon
Tampon 10X	10 X	1 X	2.5 µl
Amorce F	2 µM	0.2 µM	2.5 µL
R	2 µM	0.2 µM	2.5 µl
dNTPs	5 mM	150 µM	0.75 µl
MgCl2	50 mM	0.5 mM	0.25 µl
glycerol	99 %	4 %	1 µl
Taq polymérase	5 u	0.5 u	0.1 µl
H2O			10.4 µl

Mêmes conditions PCR

Tm Ccpm 3 et 5 = 56°C ; Tm NTCP 8 et 9 = 55°C

ANNEXE 4: ETUDE DE L'AIRE NATURELLE

- carte de l'aire naturelle
- Figure 1: AFCM et représentation arborée (NJ) de l'aire naturelle
- Figure 2: Mise en évidence de deux groupes au sein de l'aire naturelle

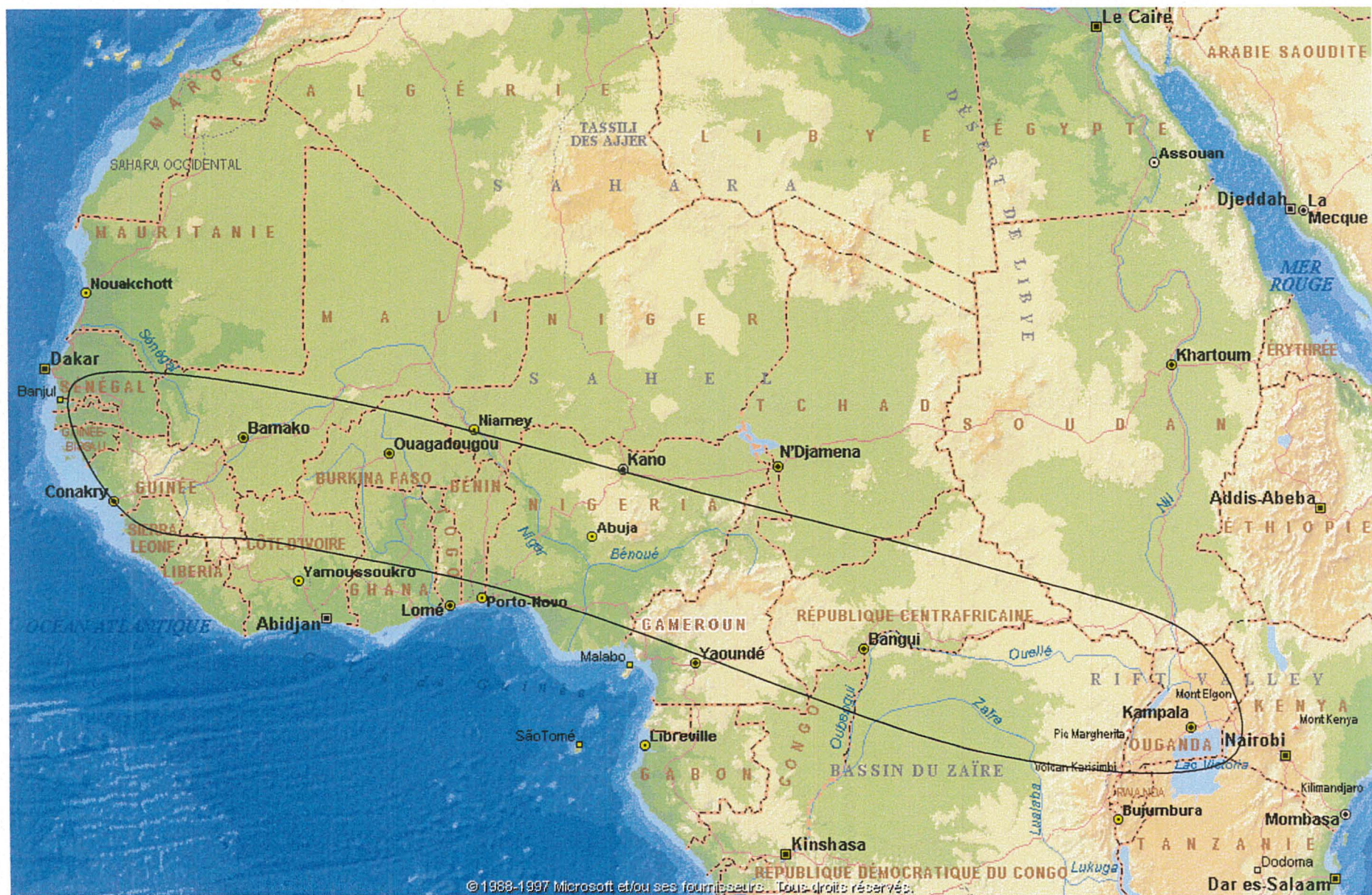


Figure 1: AFCM et représentation arborée (NJ) de l'aire naturelle

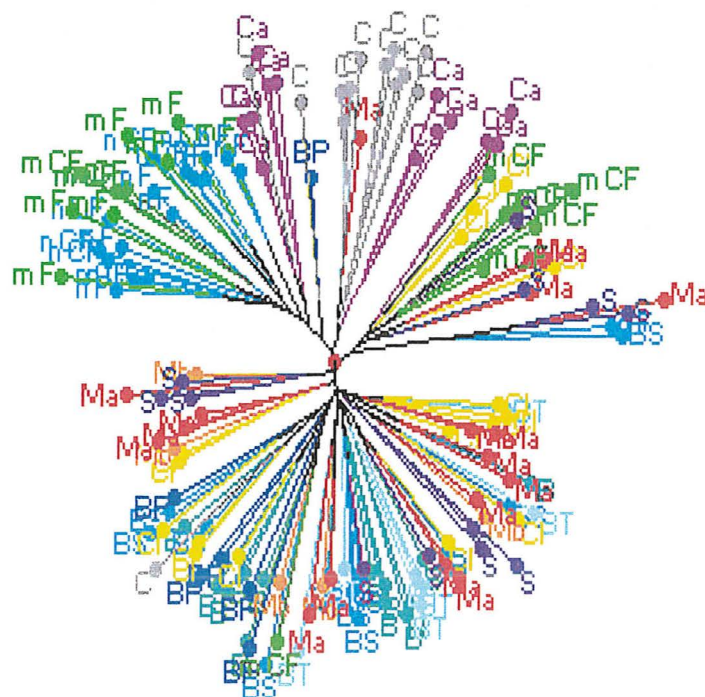
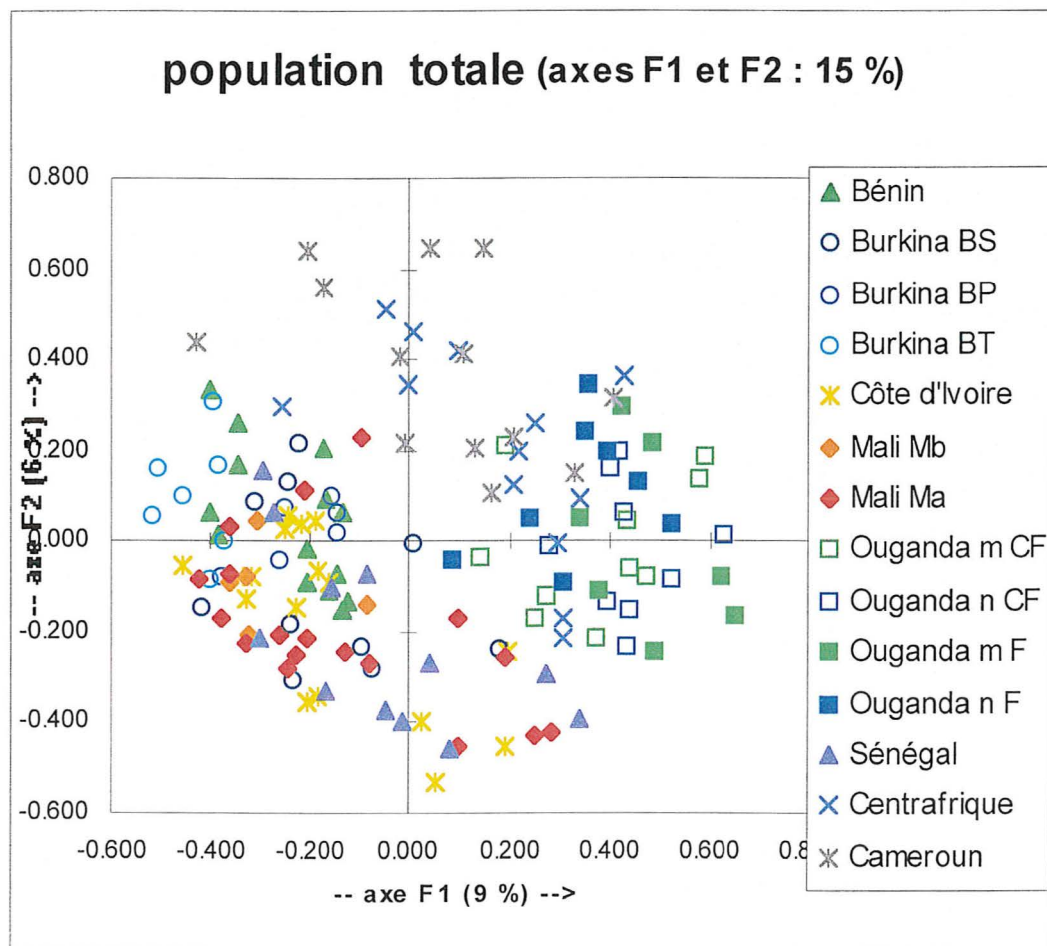
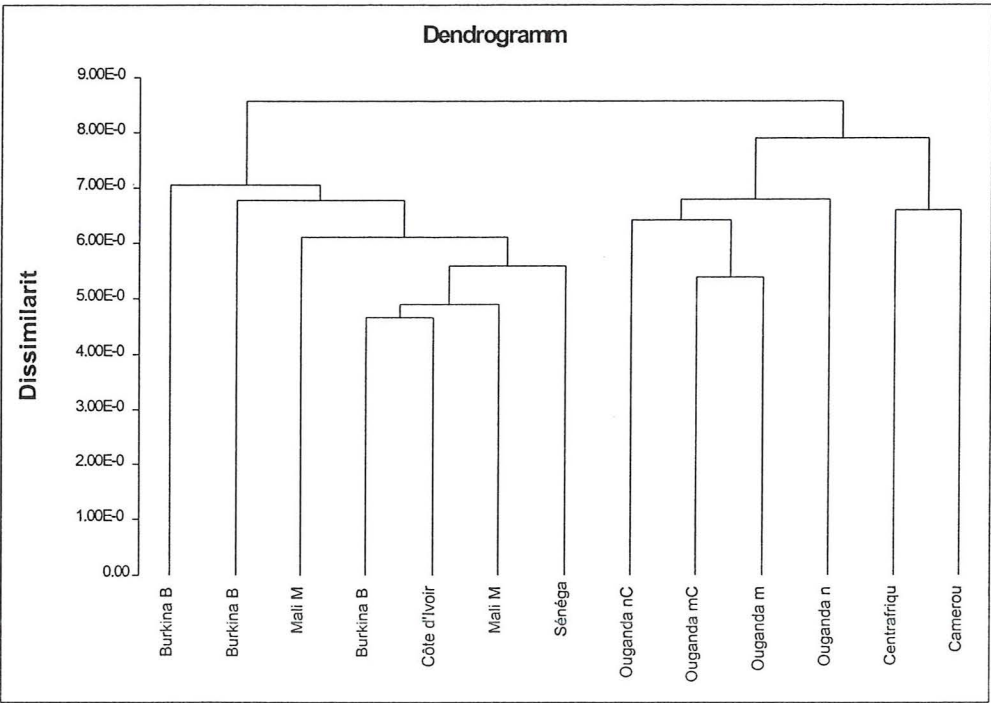
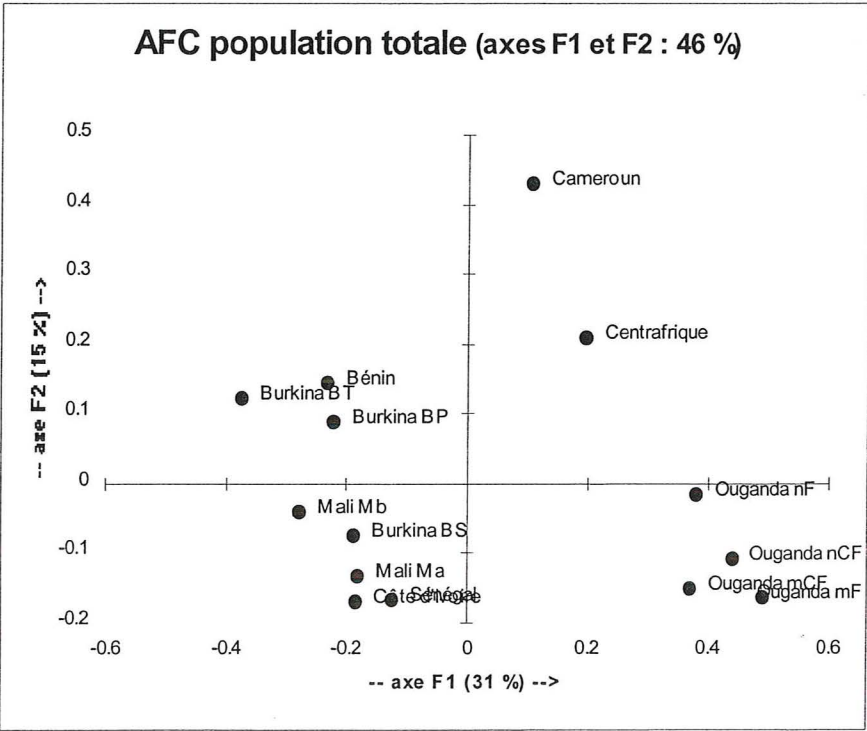


Figure 2: Mise en évidence de deux groupes au sein de l'aire naturelle



ANNEXE 5: ETUDE DES DEUX GROUPES

- carte montrant la répartition des deux groupes
- Figure 3: AFCM et représentation arborée de la population de l'ouest
- Figure 4: Mise en évidence d'un gradient est-ouest
- Figure 5: AFCM et représentation arborée de la population centre-est
- Figure 6: AFC et dendrogramme de la population centre-est



Figure 3: AFCM et représentation arborée de la population de l'ouest

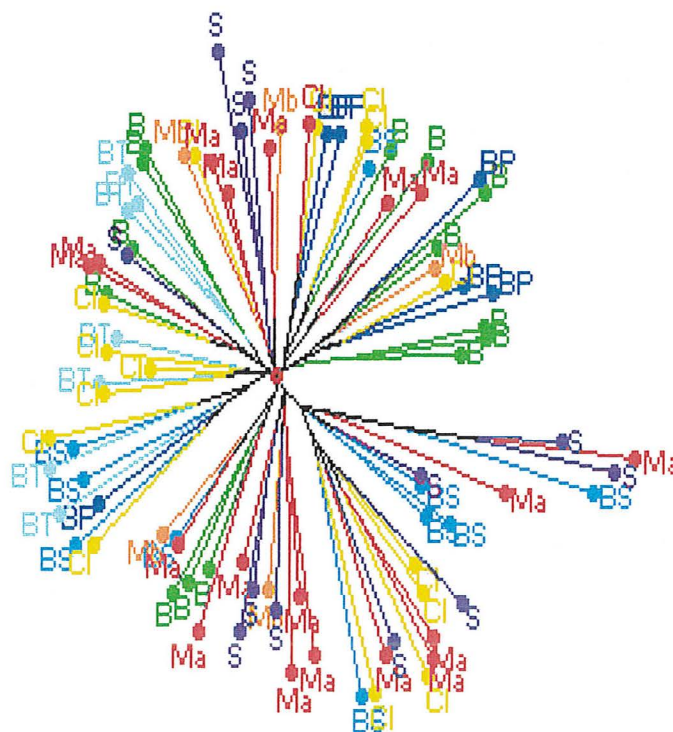
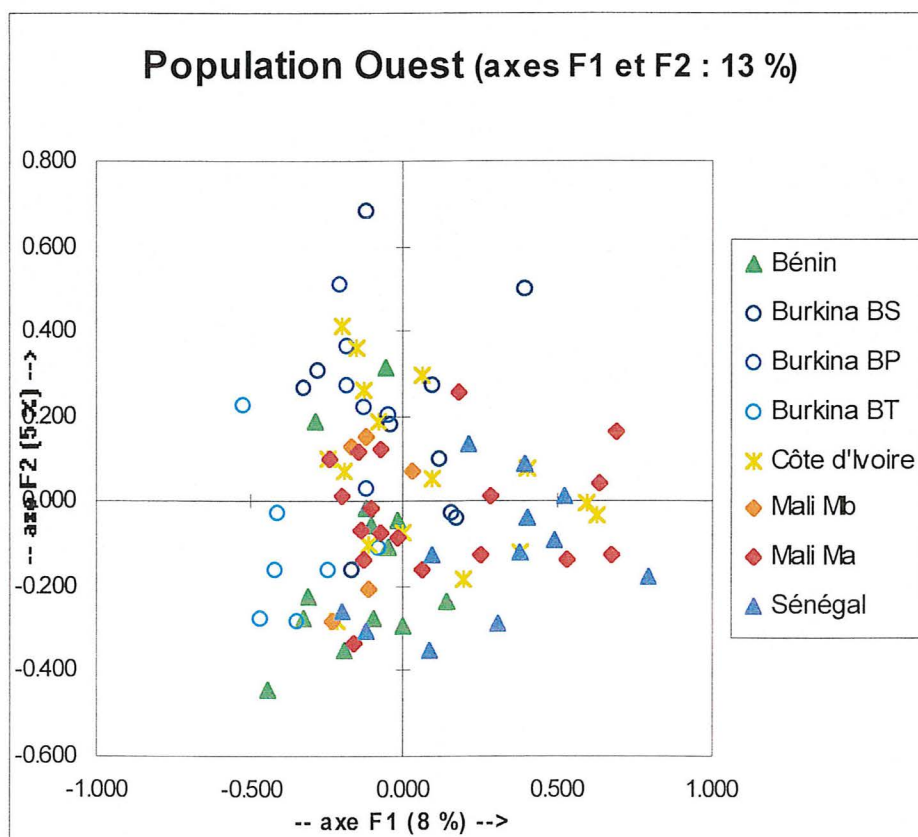


Figure 4: Mise en évidence d'un gradient est-ouest

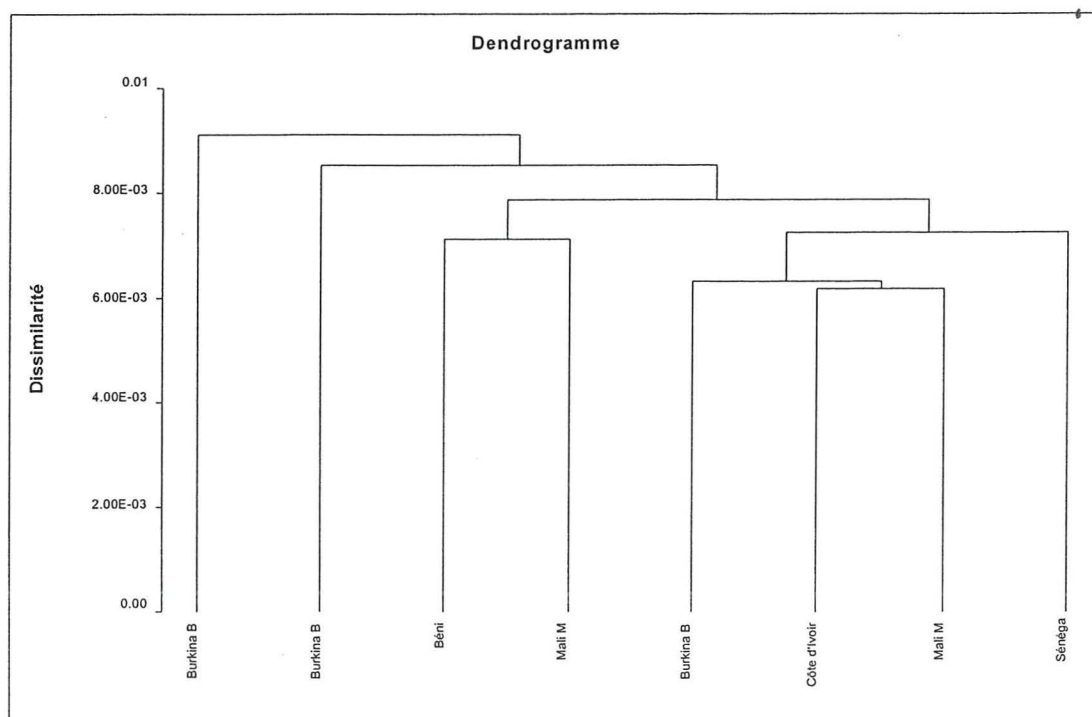
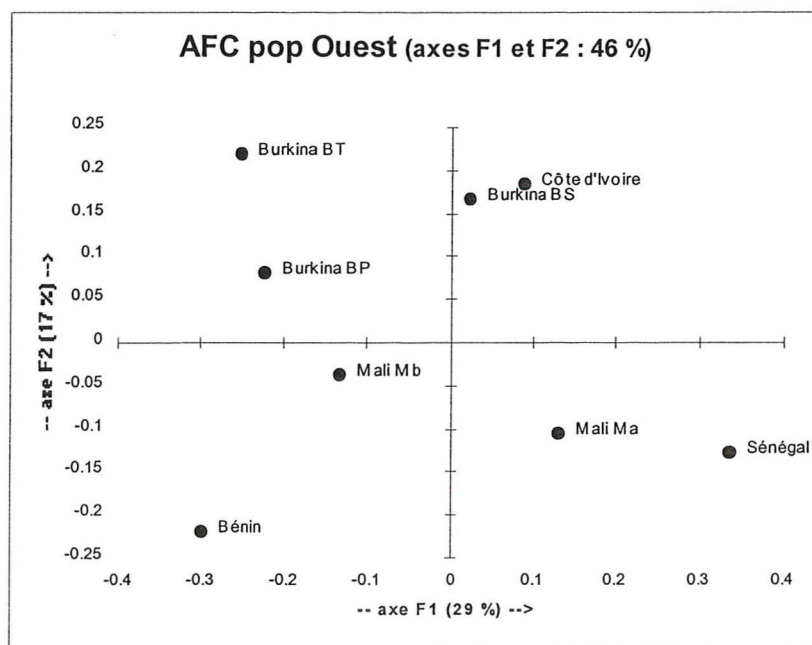


Figure 5: AFCM et représentation arborée (NJ) de la population centre-est

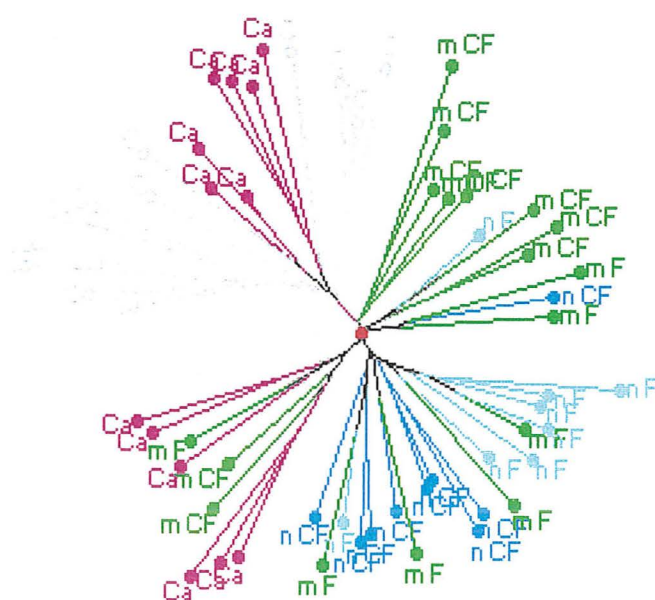
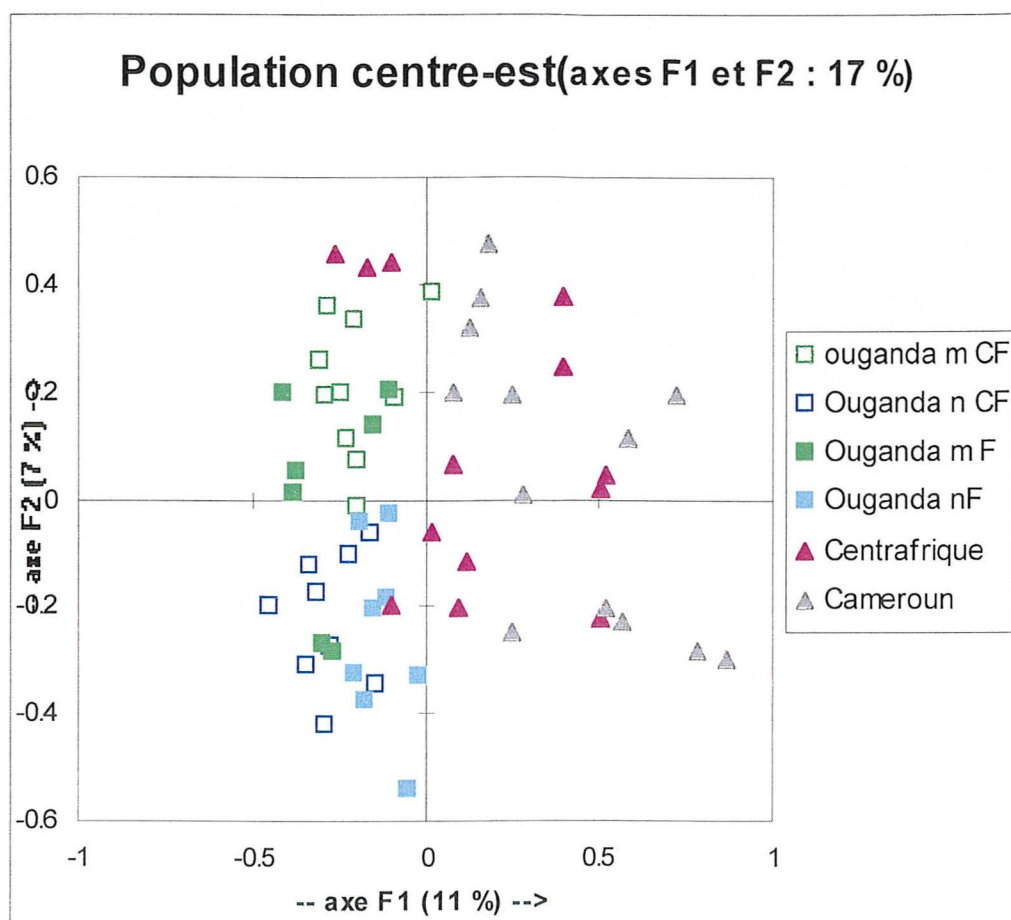
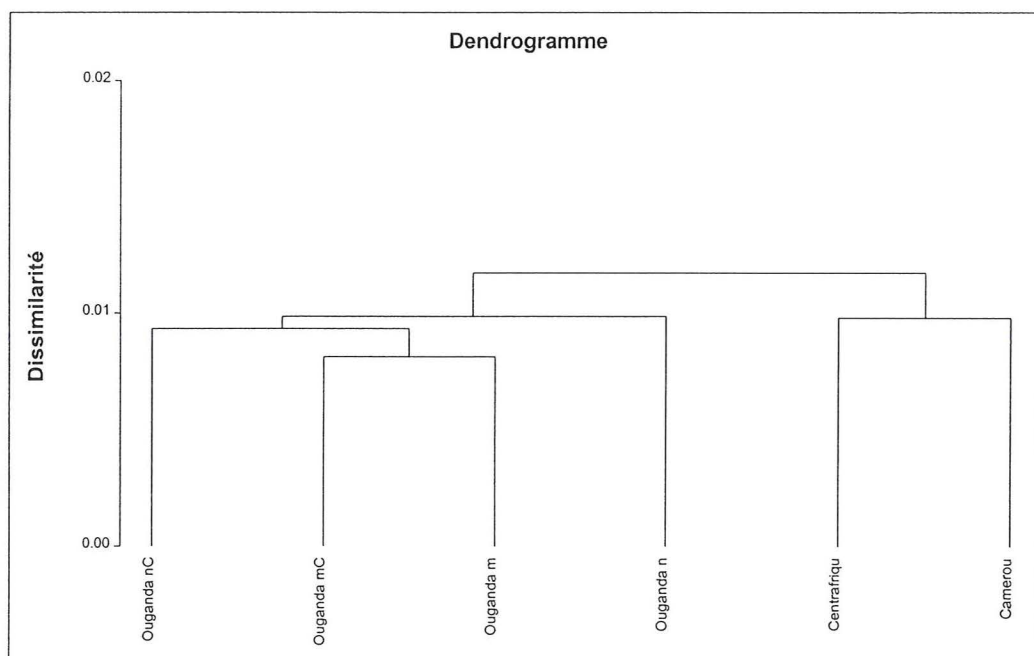
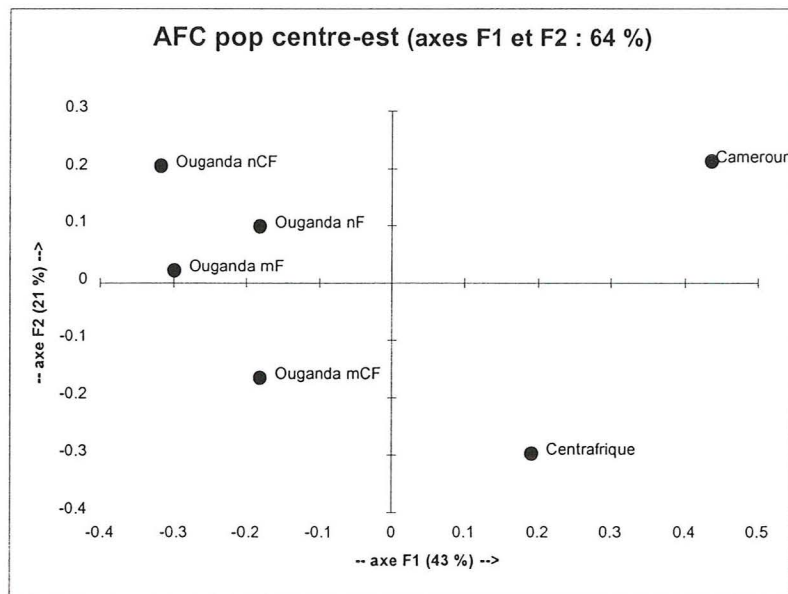


Figure 6: AFC et dendrogramme de la population centre-est



ANNEXE 6: ETUDE DES POPULATIONS D'UGANDA

- Figure 7: AFCM et représentation arborée (NJ) des populations d'Ouganda
- Figure 8: AFC et dendrogramme

Figure 7: AFCM et représentation arborée (NJ) des populations d'Ouganda

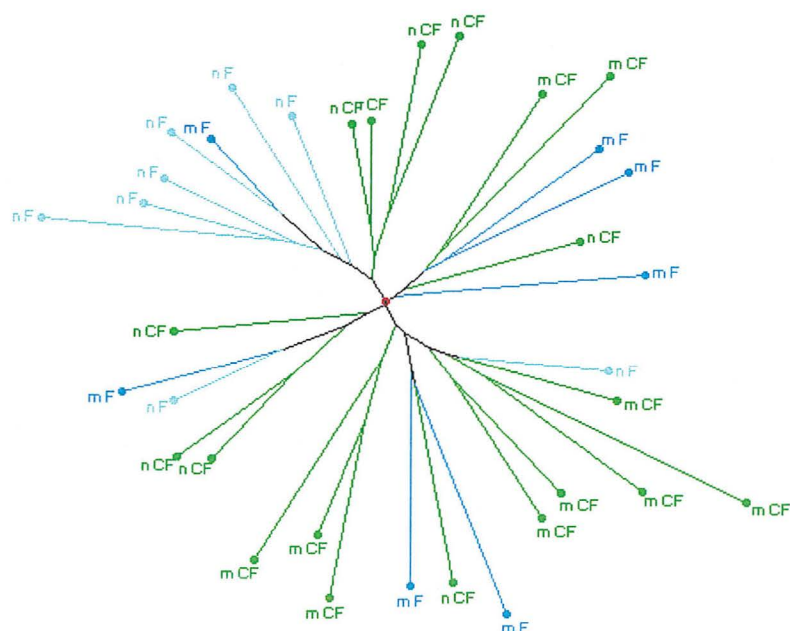
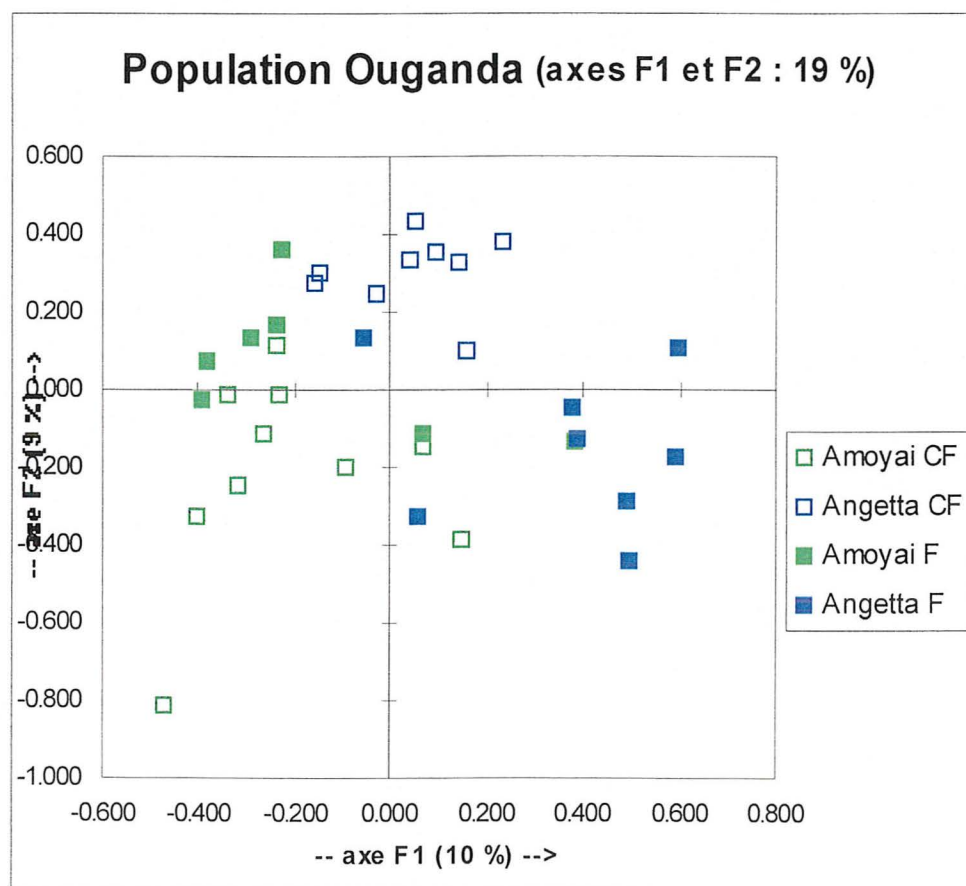
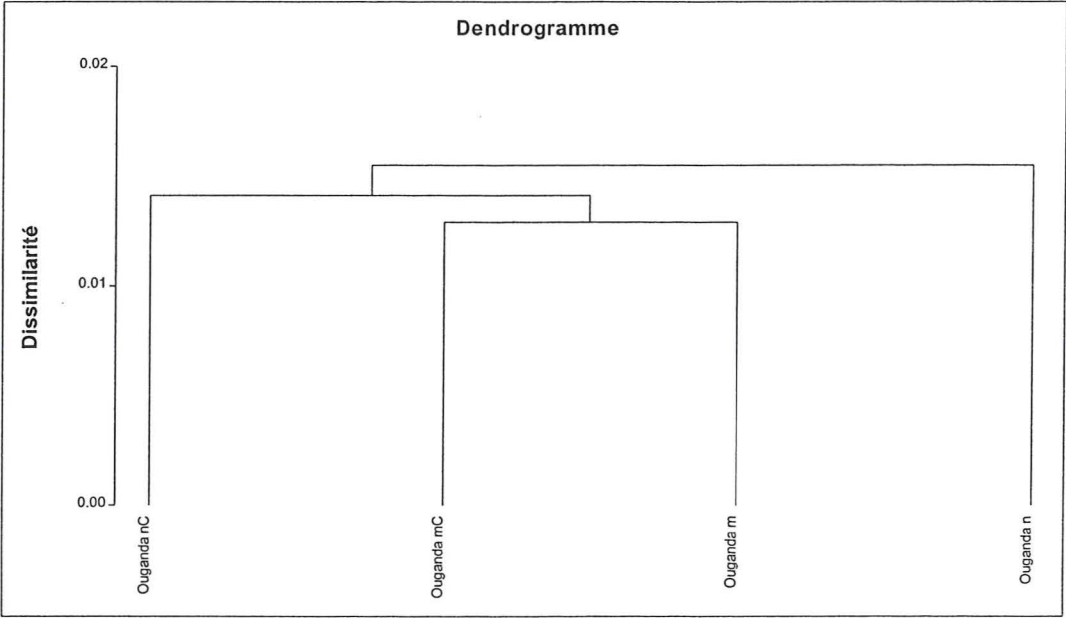
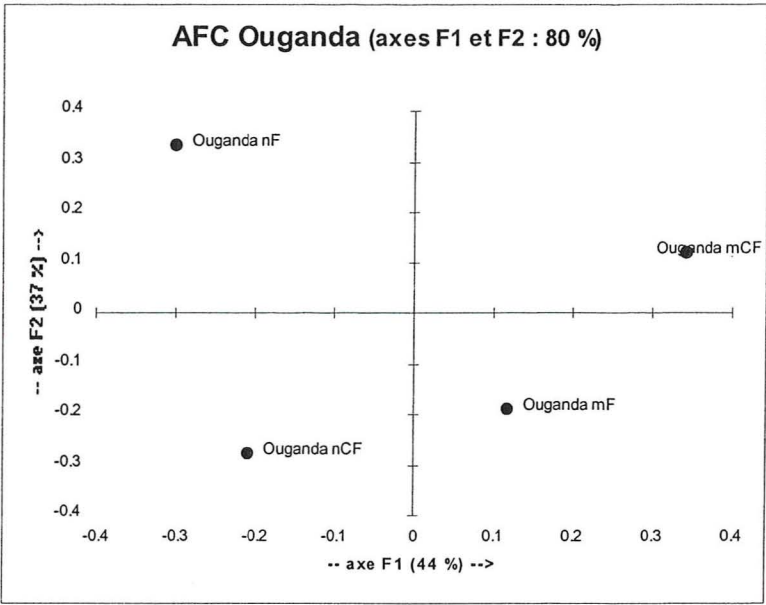
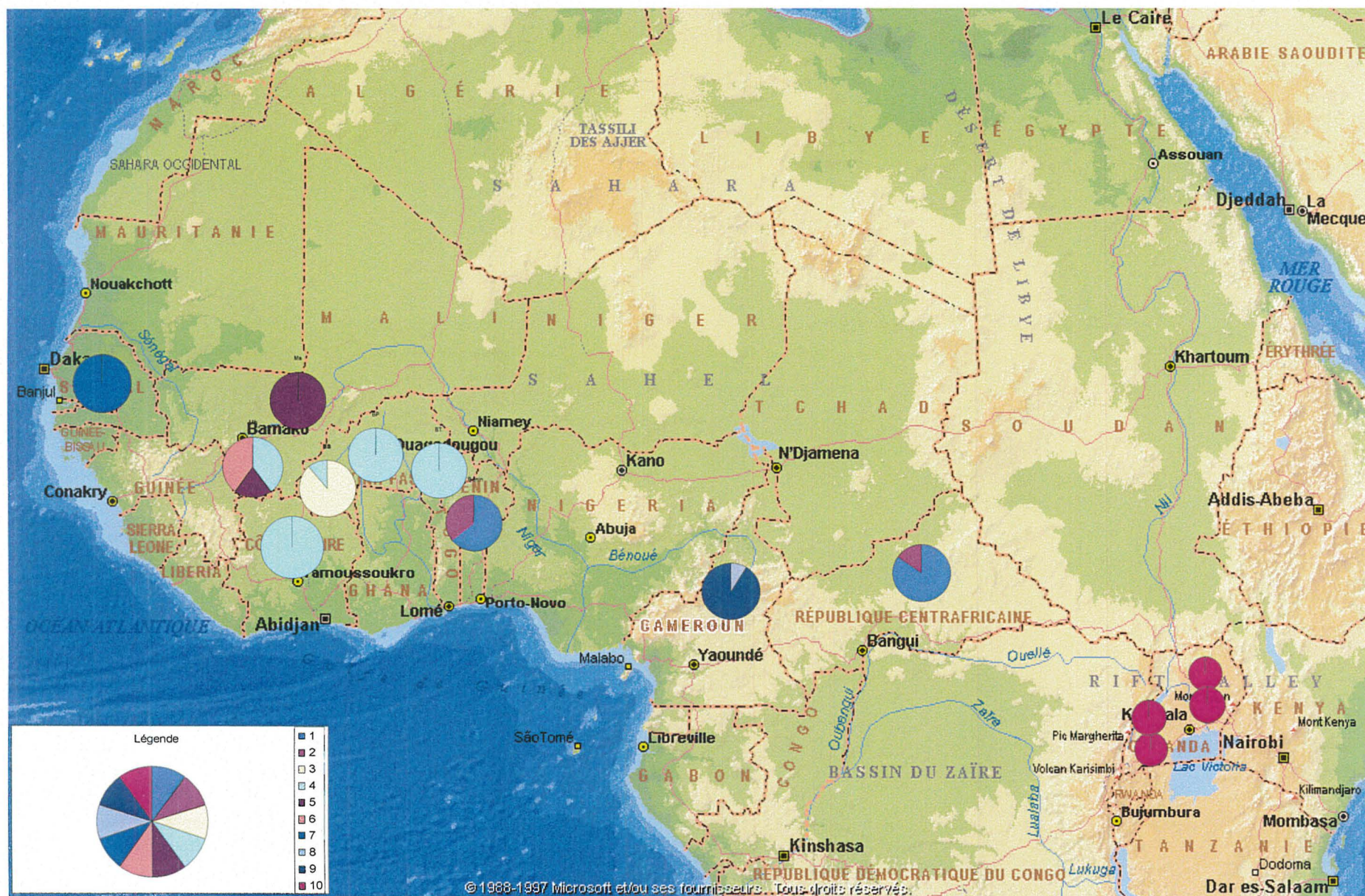


Figure 8: AFC et dedrogramme



ANNEXE 7: ETUDE DE LA REPARTITION DES CHLOROTYPES

- Répartition géographique des chlorotypes au sein de l'aire naturelle du karité
- Figure 10: Distances génétiques entre chloroplastes (D_{SH}^2)
- Figure 11: Relation entre les chlorotypes (NJ)

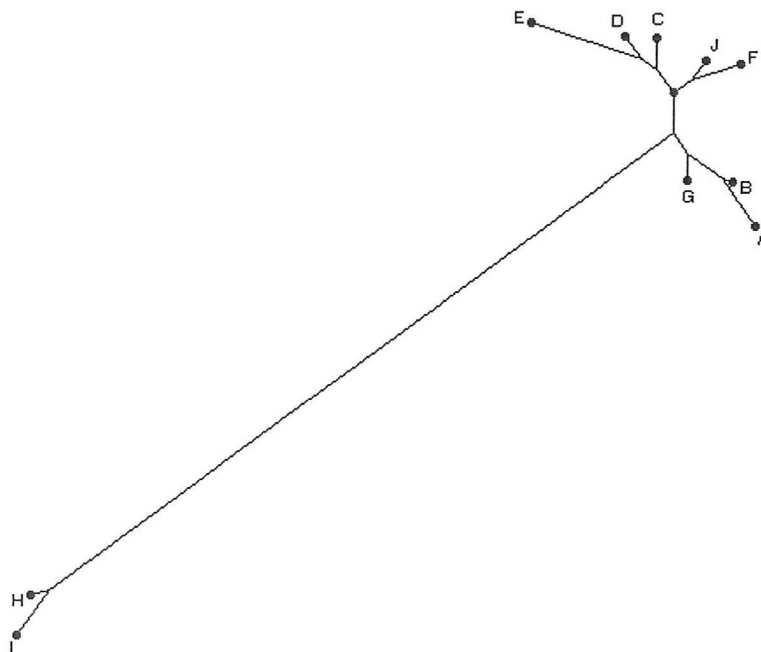


Répartition géographique des chlorotypes au sein de l'aire naturelle du karité

Figure 10: Distances génétiques entre les chloroplastes (D_{SH}^2)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	0									
B	0.25	0								
C	2.25	1	0							
D	4	2.25	0.25	0						
E	6.25	4	1	0.25	0					
F	4	2.25	2.25	1	2.25	0				
G	1	0.25	2.25	1	2.25	1	0			
H	16	12.25	12.25	16	20.25	25	16	0		
I	16	12.25	20.25	16	20.25	25	9	1	0	
J	1	0.25	0.25	1	2.25	1	1	16	16	0

Figure 11: Relation entre les chlorotypes (NJ)



RESUME

Le karité (*Vitellaria paradoxa*) représente une des principales sources de matière grasse végétale de la zone soudano-sahélienne. C'est une des espèces majoritaires des parcs agroforestiers. Il revêt donc une importance à la fois socio-économique et écologique. Une étude de diversité génétique a été réalisée sur un échantillonnage de 148 individus, représentant 14 populations réparties sur son aire naturelle, à l'aide de deux marqueurs moléculaires: les RAPD et les microsatellites chloroplastiques. 15 amorces RAPD ont permis d'obtenir 66 marqueurs. Les analyses ont montré que le karité possède une diversité génétique importante, que l'on retrouve surtout au niveau intra-population. Il existe très peu de structuration à cause d'importants flux de gènes. L'utilisation de 9 amorces chloroplastiques a révélé 4 loci polymorphes, permettant d'obtenir 10 chlorotypes. Une forte structuration a été observée avec ces marqueurs. L'analyse de la diversité génétique du karité permet de discuter du choix des marqueurs, de l'organisation de cette diversité, des hypothèses relatives à la forte structuration des chlorotypes, de la taxonomie de *Vitellaria* et d'émettre des recommandations pour la conservation et la domestication de cette espèce.

Mots-clés: *Vitellaria paradoxa* / RAPD / microsatellites chloroplastiques / diversité génétique/ flux de gènes / chlorotypes / refuges / sous-espèce / gestion.

SUMMARY

The sheanut tree (*Vitellaria paradoxa*) represents a main oleaginous product in the sub-Saharan zone. It is one of the major species in agroforestry parklands. So it has a socio-economic and ecological importance. A study of genetic diversity was conducted on a sample of 148 individuals representing 14 populations distributed in its natural range, with two molecular markers, RAPD and chloroplast microsatellites. 15 RAPD primers gave 66 markers. Analyses showed that the sheanut tree has an important genetic diversity, especially at the within population level. A very weak structuration was observed and was explained by a strong gene flow. The use of nine chloroplast primers revealed four polymorphic loci, allowing to obtain ten chlorotypes. The analysis of the genetic diversity of the sheanut tree permitted to discuss about the choice of these markers, the organization of this diversity, the hypothesis about the strong structuration of the chlorotypes, the taxonomy of *Vitellaria* and to make some recommendations for the conservation and valorisation of these specie.

Key words: *Vitellaria paradoxa* / RAPD / chloroplast microsatellites / genetic diversity / gene flow / refuges / subspecie / management.